

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANGÉLICA KARINA BERNARDELLI

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA REATIVIDADE A VASOCONSTRITORES EM  
ARTÉRIAS DE RATOS SUBMETIDOS À SEPSE INDUZIDA PELO MODELO DE  
LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO

CURITIBA

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ANGÉLICA KARINA BERNARDELLI

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA REATIVIDADE A VASOCONSTRITORES EM  
ARTÉRIAS DE RATOS SUBMETIDOS À SEPSE INDUZIDA PELO MODELO DE  
LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO

CURITIBA  
2015

ANGÉLICA KARINA BERNARDELLI

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA REATIVIDADE A VASOCONSTRITORES EM  
ARTÉRIAS DE RATOS SUBMETIDOS À SEPSE INDUZIDA PELO MODELO DE  
LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Bernardelli, Angélica Karina

Avaliação comparativa da reatividade a vasoconstritores em artérias de ratos submetidos à sepse induzida pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco. / Angélica Karina Bernardelli. – Curitiba, 2015.

73 f.: il. ; 30cm.

Orientador: José Eduardo da Silva Santos

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

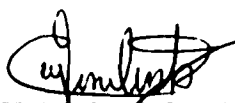
1. Choque septico. 2. Vasoconstritores. I. Título II. Santos, José Eduardo da Silva. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.1

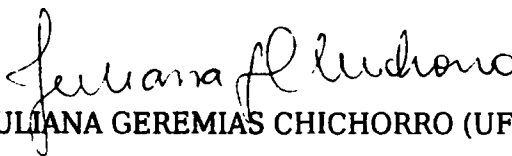
### PARECER DA BANCA EXAMINADORA

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de ANGELICA KARINA BERNARDELLI, intitulada: "AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA REATIVIDADE A VASOCONSTRITORES EM ARTÉRIAS DE RATOS SUBMETIDOS A SEPSE INDUZIDA PELO MODELO DE LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO**....., completando-se assim todos os requisitos previstos nas normas desta Instituição para a obtenção do Grau de **Mestre em FARMACOLOGIA**.

Curitiba, 10 de Dezembro de 2015.



Prof JOSÉ EDUARDO DA SILVA SANTOS (UFPR)  
(Presidente da Banca Examinadora)



Prof JULIANA GEREMIAS CHICHORRO (UFPR)



Prof YANNA DANTAS RATTMANN (UFPR)

## ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FARMACOLOGIA

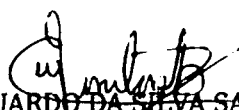
No dia dez de Dezembro de dois mil e quinze às 14:00 horas, na sala 05, Centro Politécnico, do Setor de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS da Universidade Federal do Paraná, foram instalados os trabalhos de arguição da mestranda ANGELICA MARINA BERNARDELLI para a Defesa Pública de sua Dissertação intitulada: "AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE A VASOCONSTRITORES EM ARTÉRIAS DE RATOS SUBMETIDOS À SEPSE INDUZIDA PELO MODELO DE LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO". A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Professores autores: JOSÉ EDUARDO DA SILVA SANTOS (UFPR), JULIANA GEREMIAS CHICHORRO (UFPR), YANNA DANTAS RATTMANN (UFPR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a mestranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela **APROVAÇÃO** da aluna. A mestranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora, outorgando-lhe o Grau de **Mestre em FARMACOLOGIA**. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, PATRÍCIA POTT, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 10 de Dezembro de 2015.



PATRÍCIA POTT

Secretaria do Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA



Prof JOSÉ EDUARDO DA SILVA SANTOS (UFPR)  
(Presidente da Banca Examinadora)



Prof JULIANA GEREMIAS CHICHORRO (UFPR)



Prof YANNA DANTAS RATTMANN (UFPR)

*“O que quer que você possa fazer ou sonhe que possa, faça. Coragem contém  
genialidade, poder e magia. Comece agora”.*  
*Goethe*

*“Porque o Senhor coloca sonhos dentro do nosso coração”*

*Dedico*

*Aos meus pais Maria Ivone Pirotta e Edgar Bernardelli  
Por serem luz na minha vida*

*À minha querida avó Aparecida Pirotta.  
E meu avô Pedro Pirotta in memoriam*



## AGRADECIMENTOS

*“Um coração agradecido não é somente a maior das virtudes, ele é a origem de todas as outras”. Cícero*

À Deus por conduzir meus passos e estar sempre presente. Pela segurança nos momentos difíceis.

Ao meu pai Edgar Bernardelli e minha mãe Maria Ivone por todo amor, dedicação, carinho, sabedoria e por me ensinarem o que realmente é importante na vida...Mesmo a distância não ter sido fácil, nunca deixaram de me apoiar. À vocês o meu muito Obrigada e todo o meu amor.

À minha avó pelo amor incondicional e por todo exemplo de vida. Amo você!

Ao professor José Eduardo por ter me recebido de portas abertas e por todas as orientações e sabedoria durante esses anos. Te admiro muito “Obrigada por me mostrar a importância dos detalhes”.

À professora Áurea Elizabeth Linder pela convivência e por disponibilizar o sistema de pressão arterial.

Ao Professor Jamil Assreuy que gentilmente disponibilizou o sistema de hemograma.

A Rita de Cássia por ter sido um “Anjo” na minha vida. Esse trabalho também é seu! Obrigada por todos os ensinamentos, incentivo e amizade.

Aos membros da banca a professora Juliana Chichorro e Yanna Rattmann por gentilmente terem aceito o convite para avaliar este trabalho e pelas correções.

À professora Valéria do Amaral, minha primeira professora de farmacologia e iniciação científica, que foi quem me fez apaixonar pela farmacologia e pela pesquisa. Muito Obrigada!

As minhas irmãs do coração Francieli Marcatto e Letícia Krzyzaniak (Lê depois de todos esses anos até aprendi a escrever seu sobrenome). Obrigada pela amizade de vocês. "Um amigo fiel é uma poderosa proteção: quem o achou, descobriu um tesouro" (Eclesiástico 6:14).

Ao Rodrigo, à Maria Inês e ao Fernando que ao longo desses anos se fizeram a minha família em Florianópolis. Obrigada por tudo.

Ao Danilo Macedo pelo companheirismo e amizade.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Karla Lorena, Priscila de Souza, Elaine Anton, Daiana Vogel, Thiago Correa, Rui Ascenso, Ronald Paiva e Bruna Maggi. Obrigada pelo companheirismo e amizade durante esses anos.

À querida Adriane Madeira pela alegria todas as manhãs, convivência e auxílio técnico.

Às meninas da UFPR Daiany Redivo, Isabella Dias (Isadora), Eliana Adami e Cláudia Corso. Obrigada pela amizade e conhecimento compartilhado.

Aos funcionários do departamento de Farmacologia da UFSC e UFPR obrigada por todo auxílio durante esses anos.

À FAPESC (TR2012000367 and TR201200078) e ao CNPq (448738/2014) pelo suporte financeiro.

Aos animais meu respeito e gratidão.

## RESUMO

A terapêutica na sepse é guiada pela reposição de fluidos e terapia inotrópica e vasopressora. Entretanto, existe uma hiporreatividade cardiovascular aos fármacos vasoativos, o que contribui para o aumento da mortalidade. Apesar de estabelecido o arsenal terapêutico, ainda é controversa a utilização de drogas vasopressoras, não sendo definida a verdadeira relação potencial de benefícios em estados de choque, com poucos relatos na literatura da modulação dos diferentes leitos vasculares diante dos agentes vasopressores utilizados no tratamento da sepse. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar e caracterizar o perfil de reatividade vascular em modelo experimental de sepse, frente a vasopressores endógenos e rotineiramente utilizados na clínica em humanos. Foram avaliadas as respostas contráteis por meio de curvas concentração-resposta das artérias mesentéricas, renais, carótidas e caudais à fenilefrina, noradrenalina, angiotensina II e vasopressina, em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) nos tempos 6 h e 18 h após a cirurgia. Foi verificado ainda, o efeito de bloqueadores da enzima óxido nítrico sintase (L-NAME e 1400W) na responsividade da artéria mesentérica superior à fenilefrina e noradrenalina. As respostas contráteis à fenilefrina e angiotensina II em artérias mesentéricas do grupo CLP 6 h e CLP 18 h foram significativamente menores comparadas ao grupo controle, porém não foram encontradas diferenças na responsividade à noradrenalina e vasopressina. Quando avaliada a reatividade de artérias renais do grupo CLP observou-se que a resposta permanece inalterada a todos os vasoconstritores testados. No entanto, as artérias carótidas do grupo CLP 18 h apresentaram reatividade vascular reduzida a todos os vasoconstritores testados, e apesar da fenilefrina e noradrenalina terem capacidade de aumentar o tônus da artéria carótida, estes apresentaram efeito reduzido no grupo CLP 6 h. Por outro lado, as artérias caudais apresentaram uma hiper-reatividade à vasopressina 6 h, e à noradrenalina 18 h após a CLP. O bloqueio com L-NAME foi capaz de aumentar a responsividade da artéria mesentérica superior à fenilefrina e à noradrenalina nos tempos 6 h e 18 h após a CLP. No entanto, o bloqueio da enzima óxido nítrico sintase induzida não alterou a responsividade à fenilefrina e à noradrenalina nos tempos 6 h após a CLP, diferente do observado no tempo 18 h, em que aumentou a responsividade somente à fenilefrina. Estes resultados indicam que a contratilidade vascular na sepse pode variar desde a refratariedade, hiper-reatividade ou até mesmo uma resposta inalterada aos vasopressores, de acordo com o tipo de vaso, o agente vasopressor utilizado ou o período pós sepse avaliado.

Palavras-chave: Choque séptico, disfunção vascular, vasoconstritores, hiporresponsividade.

## ABSTRACT

The therapy in sepsis is driven by fluid replacement and inotropic and vasopressor therapy. However, it is well known that sepsis is associated with vascular hyporeactivity to vasoactive drugs, which contributes to increased mortality. Although the therapeutic arsenal has been well described in the last decades, the choice of the best vasoactive agent and the beneficial and deleterious effects associated with the vasopressor therapy remains controversial. The aim of this study was to evaluate and characterize the profile of vascular reactivity of different vessels in an experimental model of sepsis, comparing the effects of different vasopressors either endogenously produced or routinely used in the clinic. For this, we evaluated the contractile responses evoked by cumulative concentration response curves of phenylephrine, norepinephrine, angiotensin II and vasopressin in mesenteric, renal, carotid and tail arteries from rats subjected to the cecal ligation and puncture (CLP) model of sepsis. The involvement of nitric oxide was tested using the nitric oxide synthase inhibitors L-NAME and 1400W. The responses to phenylephrine and angiotensin II in mesenteric arteries from CLP 6 h and CLP 18 h groups were significantly smaller than the effects obtained in preparations from control (non-septic) animals, but no differences were found in the effects of norepinephrine and vasopressin. None of the vasoconstrictors tested had their activity impaired in renal arteries from CLP groups. Nonetheless, carotid arteries from CLP 18 h group presented reduced reactivity to all tested vasoconstrictors, although only phenylephrine and norepinephrine had their ability to increase the carotid tone diminished in the CLP 6 h group. On the other hand, in spite of the reduced responsiveness to phenylephrine, tail arteries from septic rats showed increased contractile responses to vasopressin and norepinephrine at 6 h and 18 h after the CLP surgery, respectively. The blockage of nitric oxide production by L-NAME was able to increase the responsiveness of the superior mesenteric artery to norepinephrine and phenylephrine at 6 h and 18 h after the CLP surgery. Interestingly, incubation of 1400W failed to improve the vascular reactivity to phenylephrine and norepinephrine in mesenteric rings obtained from the CLP 6 h group. In addition, this selective inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide increased the vascular reactivity phenylephrine, but not to norepinephrine, at 18 h after the CLP. The results described in this study indicate that the vascular contractility in sepsis vary from the well-described refractoriness, to unaltered or even enhanced responsiveness to vasoconstrictors, accordingly with the vessel, the vasoactive agent, or the period evaluated.

**Keywords:** Septic shock, vascular dysfunction, vasoconstrictors, hyporesponsiveness.

## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO</b>	19
1.1. BREVE HISTÓRICO	19
1.2. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE	20
1.3. FISIOPATOLOGIA DA SEPSE	22
1.4. SISTEMA CARDIOVASCULAR NA SEPSE: DO FISIOLÓGICO AO PATOLÓGICO	23
1.5. TERAPIA VASOPRESSORA NO CHOQUE SÉPTICO	27
1.5.1. Farmacologia dos vasoconstritores utilizados na sepse	27
<b>II. OBJETIVOS</b>	30
2.1. OBJETIVO GERAL	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS</b>	31
3.1. ANIMAIS	31
3.2. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	31
3.2.1. Indução da sepse: Modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP)	31
3.2.2. Avaliação da sobrevida	32
3.2.3. Avaliação do peso corpóreo	32
3.2.4. Avaliação da temperatura corpórea	32
3.2.5. Dosagens hematológicas	33
3.2.6. Avaliação da pressão arterial sistólica em ratos acordados	33
3.3. PREPARAÇÕES ISOLADAS: EXPERIMENTOS IN VITRO	34
3.3.1. Técnica de remoção e montagem de vasos em cubas de órgão isolado	34
3.3.2. Investigação da responsividade vascular à fenilefrina e noradrenalina em animais falso operados	35
3.3.3. Investigação da responsividade vascular a vasoconstritores na sepse	36

3.3.3.1. Artéria Mesentérica .....	36
3.3.3.2. Artéria Carótida .....	36
3.3.3.3. Artéria Renal .....	36
3.3.3.4. Artéria Caudal .....	37
3.4. DROGAS E SAIS.....	38
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
4.1. CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE.....	39
4.2. DOSAGENS HEMATOLÓGICAS .....	41
4.3. RESPOSTA CONTRÁTIL A VASOCONSTRITORES EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE ANIMAIS SUBMETIDOS A FALSA CIRURGIA NÃO DIFERE DO NAIVE .....	41
4.4. VASOS DE ANIMAIS SUBMETIDOS A CIRURGIA DE LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO NÃO APRESENTAM REDUÇÃO NA CONTRAÇÃO INDUZIDA PELO KCI.....	42
4.5. INFLUÊNCIA DA SEPSE NA REATIVIDADE VASCULAR DA ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR A VASOCONSTRITORES.....	44
4.6. RESPONSABILIDADE INALTERADA EM ARTÉRIAS RENAIIS A VASOCONSTRITORES NA SEPSE .....	46
4.7. AS RESPOSTAS CONTRÁTEIS A VASOCONSTRITORES ESTÃO REDUZIDAS NA ARTÉRIA CARÓTIDA DE RATOS SUBMETIDOS À CLP .....	46
4.8. INFLUÊNCIA DA SEPSE NA RESPOSTA DA ARTÉRIA CAUDAL A VASOCONSTRITORES .....	46
4.9. PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA REATIVIDADE DA ARTÉRIA MESENTÉRICA À FENILEFRINA E NORADRENALINA. ....	55
<b>V. DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>VI. CONCLUSÃO .....</b>	<b>66</b>
REFERÊNCIAS.....	67

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Fluxograma dos eventos cardiovasculares envolvidos na fisiopatologia do choque séptico.....	22
FIGURA 2- Padronização do modelo experimental de sepse induzida pelo modelo de cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	36
FIGURA 3- Reatividade vascular do grupo falso operado e do grupo naïve.....	39
FIGURA 4- Reatividade inalterada ao KCl em artérias de ratos submetidos ao modelo de ligadura e perfuração do ceco.....	41
FIGURA 5- Artérias mesentéricas de ratos submetidos à CLP e sua redução na reatividade à fenilefrina e angiotensina II, mas não para a noradrenalinavasopressina.....	43
FIGURA 6- Manutenção da resposta a vasoconstritores em artérias renais de ratos submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	44
FIGURA 7- Redução da reatividade vascular a vasoconstritores em artérias carótidas de ratos submetidos ao modelo de ligadura e perfuração do ceco.....	47
FIGURA 8- A artéria caudal de ratos submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco apresenta respostas reduzidas à fenilefrina, mas é hiper-reativa à noradrenalina e à vasopressina.....	49

FIGURA 9- Bloqueio do óxido nítrico sintase pelo L-NAME restaura a  
responsividade em artéria mesentérica superior à fenilefrina em ratos  
submetidos ao modelo de ligadura e perfuração do 53  
ceco.....

FIGURA 10- Bloqueio seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzida  
restaura a responsividade em artéria mesentérica superior à fenilefrina em  
ratos submetidos ao modelo de ligadura e perfuração do 54  
ceco.....



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Alterações hematológicas do grupo submetido à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	38
TABELA 2- Reatividade vascular da artéria mesentérica superior dos grupos naive e submetido a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco a vasoconstritores.....	40
TABELA 3- Reatividade vascular da artéria mesentérica superior do grupo controle e grupo submetido à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco a vasoconstritores.....	45
TABELA 4- Reatividade vascular de artéria renal do grupo controle e submetido à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco a vasoconstritores.....	46
TABELA 5- Reatividade vascular da artéria carótida obtida dos grupos controle e submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco a vasoconstritores.....	48
TABELA 6- Reatividade vascular de artérias caudal do grupo controle e submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco a vasoconstritores.....	50
TABELA 7- Efeito do bloqueio da enzima óxido nítrico sintase sobre a resposta máxima de contração da artéria mesentérica superior do grupo controle e submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração.....	52
TABELA 8- Efeito do bloqueio seletivo da enzima óxido nítrico sintase sobre a resposta máxima de contração da artéria mesentérica superior do grupo controle e submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

1400W- N-([3-(Aminometil) - benzil] acetamidina  
a.C- Antes de Cristo  
ANOVA- Análise de variância  
AVP- Vasopressina  
Ca<sup>2+</sup>- Cálcio  
CE 50- Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo  
CIVD- Coagulação intravascular disseminada  
CLP- Ligadura e perfuração do ceco  
DAG- Diacilglicerol  
ECA- Enzima conversora de angiotensina  
Emax- Resposta máxima  
eNOS (NOS 3) - Sintase endotelial do óxido nítrico  
FC- Frequência cardíaca  
IL-1  $\beta$ - Interleucina 1 $\beta$   
IL-10- Interleucina 10  
ILA- Instituto latino americano de sepse  
iNOS (NOS 2) - Sintase induzida do óxido nítrico  
IP3- Inositol trifosfato  
KCl- Cloreto de potássio  
L-NAME- N- $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster  
LPS- Lipopolissacarídeo  
MHC- Complexo principal de histocompatibilidade  
MLC- Cadeia leve de miosina  
nNOS (NOS 1)- Sintase neuronal do óxido nítrico  
NO- Óxido nítrico  
PAM- Pressão arterial média  
PAMPAs- (Padrões moleculares associados aos patógenos)  
PAS- Pressão arterial sistólica  
PKC- Proteína cinase C  
PRRs- Receptores de reconhecimento padrão  
ROS- Espécies reativas de oxigênio

SHAM- Falso operado

TLR- Receptor *Toll like*

TNF- $\alpha$ - Fator de necrose tumoral alfa

## I. INTRODUÇÃO

### 1.1. BREVE HISTÓRICO

A sepse grave e o choque séptico estão entre as patologias mais antigas e urgentes da medicina (DEREK *et al.*, 2013), acompanhando manuscritos de Hipócrates que datam de 400 a.C. os quais descrevem que “quando a febre é contínua, a superfície externa do corpo está fria e existe internamente uma grande sensação de calor e sede, a afecção é mortal”. A palavra "sepse" tem origem do grego e se refere à decomposição de material orgânico na presença de bactérias (GEROULANOS *et al.*, 2006). Sua primeira utilização no contexto médico ocorreu a mais de 2.700 a.C. nos poemas de Homero (FUNK *et al.*, 2009).

A história das doenças infecciosas se entrelaça com a história da microbiologia a partir do século XVII, quando em 1683 com a descoberta do microscópio, o holandês Anton Van Levanhock identificou as bactérias pela primeira vez. Em 1840, Friedrich Gustav Jakob Henle sugeriu que microrganismos poderiam causar doenças. Em 1866, Pasteur sustentou a teoria de que os germes são causadores de doenças (DA SILVA, 2007) e, em 1879-80 foi demonstrado pela primeira vez a presença de bactérias no sangue de pacientes com septicemia puerperal (ANNANE; BELLISSANT; CAVAILLON, 2005). As teorias iniciais das doenças infecciosas defendida por Hipócrates e Galeno permaneceram sem contestação, até as descobertas descritas por Lister, Koch e Pasteur sobre técnicas de desinfecção e esterilização, as quais contribuíram para avanços significativos acerca da mudança de paradigma na forma como a sepse era vista (FUNK *et al.*, 2009).

Os rumos da microbiologia mudaram a partir de 1928, quando Fleming descobriu uma substância, à qual deu o nome de penicilina, capaz de inibir o crescimento microbiano, inaugurando a chamada “era ouro dos antibióticos” (FUNK *et al.*, 2009). Porém, após o desenvolvimento das primeiras penicilinas, a resistência microbiana logo apareceu, e voltamos à era pré-antibiótica, culminando com breves períodos de arrogância após o advento dos antibióticos de amplo espectro de ação, quando o General William H. Stewart nos Estados Unidos declarou: “poderíamos ‘fechar o livro das doenças infecciosas’” (ZARYCHANSKI *et al.*, 2009). Entretanto, não era de fato possível fechar o livro das doenças infecciosas, pois muitos pacientes com

sepse, apesar da instituição de terapia antimicrobiana, adquiriam quadros de hipotensão e instabilidade hemodinâmica, recorrendo-se à utilização de vasopressores em um quadro chamado choque séptico, geralmente letal.

A princípio os conceitos de definição para o choque eram puramente filosóficos, próprios para o nível de conhecimento científico da época como os de Samuel Gross (1872), que definiu choque como “desarranjo rude na máquina da vida”, ou Johns Collins Warren (1895), que o denominou “pausa momentânea no ato da morte”, sendo o cirurgião inglês George James Guthrie, em seu livro publicado em 1815 o primeiro que utilizou a palavra choque com a conotação de “instabilidade hemodinâmica” (SILVA, PENILDON, 2010). Desde então, a compreensão das manifestações cardiovasculares e o entendimento das características hemodinâmicas da síndrome progrediu, devido a aplicação de monitoramento cada vez mais sofisticado e das técnicas de investigação (RABUEL, MEBAZA, 2006; KUMAR, HAERY, PARRILLO, 2001).

Sugere-se que George Crile, um fisiologista e cirurgião cardiovascular, tenha sido o primeiro a usar infusões de produtos de adrenalina, o que teria ocorrido entre 1900-1910. Ao longo da década de 1970, vasopressores e inotrópicos foram estudados e, apesar de décadas de desenvolvimento e uma longa história de uso, ainda permanece o debate sobre a melhor escolha de vasopressor ou inotrópico para o uso na sepse (ZARYCHANSKI *et al.*, 2009). Segundo Ellender; Skinner, (2008), existem poucos estudos que fornecem evidências de um vasopressor ou agente inotrópico especial para uso no início do choque e a maioria das recomendações são baseadas em grande parte na modelagem farmacodinâmica, pesquisas com animais e na experiência empírica, com um número limitado de testes em humanos. Ainda de acordo com Tallo *et al.*, (2008), a utilização de aminas vasoativas é controversa, não sendo definida a verdadeira relação potencial de benefícios das mesmas em estados de choque.

## 1.2. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE

A sepse grave e o choque séptico são o resultado final de interações complexas entre o organismo infectante e a cascata de resposta do sistema imune, refletindo uma resposta, que por vezes tem sido descrita como inadequada por parte do hospedeiro ao patógeno (NDUKA & PARRILLO, 2009). Bactérias gram-positivas são

identificadas em mais da metade dos casos de sepse. Porém, bactérias gram negativas, fungos e vírus também são causadores em potencial (KING *et al.*, 2014).

A patologia conhecida hoje como “sepse” recebeu diversas denominações ao longo do tempo, visto que, não existia uma definição padronizada de sepse, e esta muitas vezes era confundida com a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). Em 1991, com a finalidade de unificar os termos, foi realizada uma Conferência de Consenso feita pelo *American College of Chest Physicians and The Society of Critical Care Medicine*, revisada em 2001, visando padronizar os termos bem como definir os critérios de diagnóstico. Nesse documento a SIRS ficou definida como um conjunto de manifestações clínicas em resposta a uma agressão orgânica grave que ocorre necessariamente na ausência de infecção, sendo caracterizada pela presença de dois ou mais dos seguintes sintomas: temperatura  $>38^{\circ}\text{C}$  ou  $<36^{\circ}\text{C}$ ; frequência cardíaca  $>90$  bpm; frequência respiratória  $>20$  movimentos/minuto; leucometria  $>12.000/\text{mm}^3$  ou  $<4.000/\text{mm}^3$  ou ainda presença de mais de 10% de neutrófilos imaturos. A sepse, por sua vez, ficou definida como uma situação clínica em que há presença dos sinais e sintomas (SIRS) secundários a um processo infeccioso. Já a sepse grave trata-se de um quadro de sepse associada à disfunção orgânica, tais como cardiovascular, respiratória, renal, hematológica e do sistema nervoso central, e o choque séptico como uma sepse grave com hipotensão arterial e alteração na perfusão refratária à reposição volêmica adequada (BONE *et al.*, 1992).

Apesar de um longo tempo de pesquisa e dos avanços significativos na terapia antimicrobiana e de suporte, a mortalidade decorrente da sepse grave e do choque séptico permanece alta, refletindo as atuais abordagens terapêuticas (ANGUS *et al.*, 2001). Estima-se que em todo o mundo de 20 a 30 milhões de pessoas sejam acometidas anualmente por sepse (REINHART; DANIELS; MACHADO, 2013). Segundo dados da pesquisa do Instituto Latino Americano de Sepse (ILA), entre 2005 a 2013 houve uma mortalidade de 34,8% no Brasil e de 23,9% no mundo entre pacientes acometidos por sepse grave e de 64,5% no Brasil e de 37,4% no mundo entre pacientes com diagnóstico de choque séptico. Segundo Martin *et al.*, (2003), entre 1979 e 2000 nos Estados Unidos houve aproximadamente 750 milhões de internações decorrentes de sepse, além de um aumento anual na incidência de 8,7% de casos novos por ano no mesmo período. Além disso, o ônus econômico da sepse se mostrou crescente, com custos de aproximadamente U\$ 17 bilhões por ano. Cabe

ressaltar que a falência de órgãos contribuiu cumulativamente para o aumento da mortalidade, sendo maiores as chances de sobrevivência entre os pacientes com menos de três órgãos em falência.

### 1.3. FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

Para entender de forma clara a fisiopatologia da sepse é necessário recorrer ao sistema imune, “o gatilho” inicial para toda a cascata de eventos que ocorre na sepse. Na fase inicial da resposta inflamatória esse papel é atribuído ao sistema imune inato. Embora esse sistema tenha sido descrito por mais de um século atrás por Elie Metchnikoff, sua relevância na sepse ganhou destaque com a descoberta dos receptores *Toll-like* (TLR), imprescindíveis na resposta imunológica desencadeada pela sepse (MEDZHITOV, 2001).

A estratégia de reconhecimento do sistema imune é baseada na identificação de produtos constitutivos e conservados do metabolismo microbiano, os chamados PAMPs (padrões moleculares associados aos patógenos). As células de defesa reconhecem estas estruturas através dos PRRs (receptores de reconhecimento padrão (que são expressos na superfície da célula ou em compartimentos intracelulares), principalmente os receptores do tipo *toll* (TLR), responsáveis pela opsonização, ativação do sistema complemento, fagocitose, cascata de coagulação, ativação de sinalização pró-inflamatória e indução de apoptose (para maiores detalhes ver revisão de MEDZHITOV, 2001). Em mamíferos, são conhecidos pelo menos 10 tipos diferentes de TLRs, e cada um tem uma função diferente e específica, baseada na sua constituição estrutural (AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001). Por exemplo, os receptores Toll-like do tipo 2 (TLR-2) reconhecem os peptídeoglicanos das bactérias gram-positivas, enquanto os lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias gram-negativas são reconhecidos pelos TLR-4 (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000a; MEDZHITOV; JANEWAY, 2000b). Os receptores *toll* compreendem uma família de receptores transmembrana caracterizados por uma rica repetição de leucina. O ligante liga-se a um local no domínio extracelular do receptor e induz uma alteração conformacional que ativa os domínios citoplasmáticos, permitindo a interação e montagem de proteínas adaptadoras (HASHIMOTO, 1988).

A ativação das vias de transdução de sinal conduz à translocação nuclear do fator nuclear Kappa B e culmina na expressão gênica de um grande número de

mediadores inflamatórios, incluindo citocinas pró- inflamatórios como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), bem como a produção de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-10 (IL-10), ativação do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), e a indução de várias moléculas efetoras tais como a enzima óxido nítrico sintase induzida (THOMAS *et al.*, 2001). A sepse é desencadeada por uma resposta pró-inflamatória local que se torna sistêmica, ainda de acordo com a progressão do quadro clínico, acontece a fase de imunossupressão, no entanto não é conhecido se os eventos têm uma maior participação da resposta inflamatória ou anti-inflamatória (SAGY; AL-QAQAA; KIM, 2013). Ainda, a ativação de citocinas/quimiocinas fazem com que ocorra um descompasso no sistema hemostático orquestrando um quadro de coagulação intravascular disseminada (CIVD) conduzindo em alterações hemodinâmicas com a formação de trombose microvascular e deposição de fibrina, o que pode acarretar na oclusão de vasos importantes, complicando ainda mais o quadro clínico, devido a hipoperfusão (HARDAWAY; WILLIAM; VASQUEZ, 2001). Assim, o sistema cardiovascular, com a participação do sistema nervoso simpático e em meio à produção exacerbada de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios, exerce papel de destaque como os sistemas mais afetados ao longo na sepse.

#### 1.4. SISTEMA CARDIOVASCULAR NA SEPSE: DO FISIOLÓGICO AO PATOLÓGICO

A história da descoberta do sistema cardiovascular evoluiu ao longo do tempo e contou com a participação de nomes importantes, como por exemplo Herófilo (323-285 a.C.), fisiologista e anatomista em Alexandria, que contribuiu consideravelmente para o conhecimento da anatomia cardíaca e muito se aproximou do que conhecemos hoje acerca da circulação sanguínea. Ele foi o primeiro a realizar dissecações em humanos, sendo considerado o “pai da anatomia”. Descreveu a artéria carótida, a veia subclávia, os vasos esplâncnicos, entre outros. Também aplicou seus conhecimentos estudando a intensidade e ritmo dos pulsos cardíacos (BOUSTANI, 2007; KARAMANOU *et al.*, 2015). Um outro fisiologista e anatomista que contribuiu consideravelmente para a anatomia cardíaca foi Erasístrato (310-250 a.C.) ao relatar o papel das válvulas tricúspede e pulmonar. Ainda devemos a ele uma ampla descrição anatômica dos vasos, como a artéria renal, artéria mesentérica e a veia



cava (BARIÉTY; COURY, 1963). Séculos depois Galeno (130-200 d.C.), médico cirurgião e anatomista, distinguiu as artérias das veias, o sangue venoso do arterial, porém tinha como teoria que o sangue subia e descia como uma maré, dando origem ao pulso, dos quais os descreveu como forte, fraco, regular e irregular (ANDROUTSOS *et al.*, 2013). Galeno ao realizar dissecações descreveu a presença de válvulas cardíacas, mas até então não reconhecia sua função. Séculos mais tarde o médico inglês William Harvey, em 1628 d.C., conseguiu montar o “quebra cabeça” do sistema cardiovascular, ao descrever a circulação sanguínea como um sistema fechado, concluindo que devido a presença das válvulas de interposição o sangue não poderia ser enviado através das veias aos órgãos e tecidos, devendo-se assim ser enviado pelas artérias, e voltar através das veias cujas válvulas não iriam se opor ao seu curso (GEDDES, 2008).

A principal função do sistema cardiovascular é transportar oxigênio e nutrientes para os tecidos, bem como remover as escórias metabólicas como o dióxido de carbono e outros produtos resultantes do metabolismo celular. Para isso conta com a ajuda de um elaborado sistema vascular, conforme segue descrição abaixo.

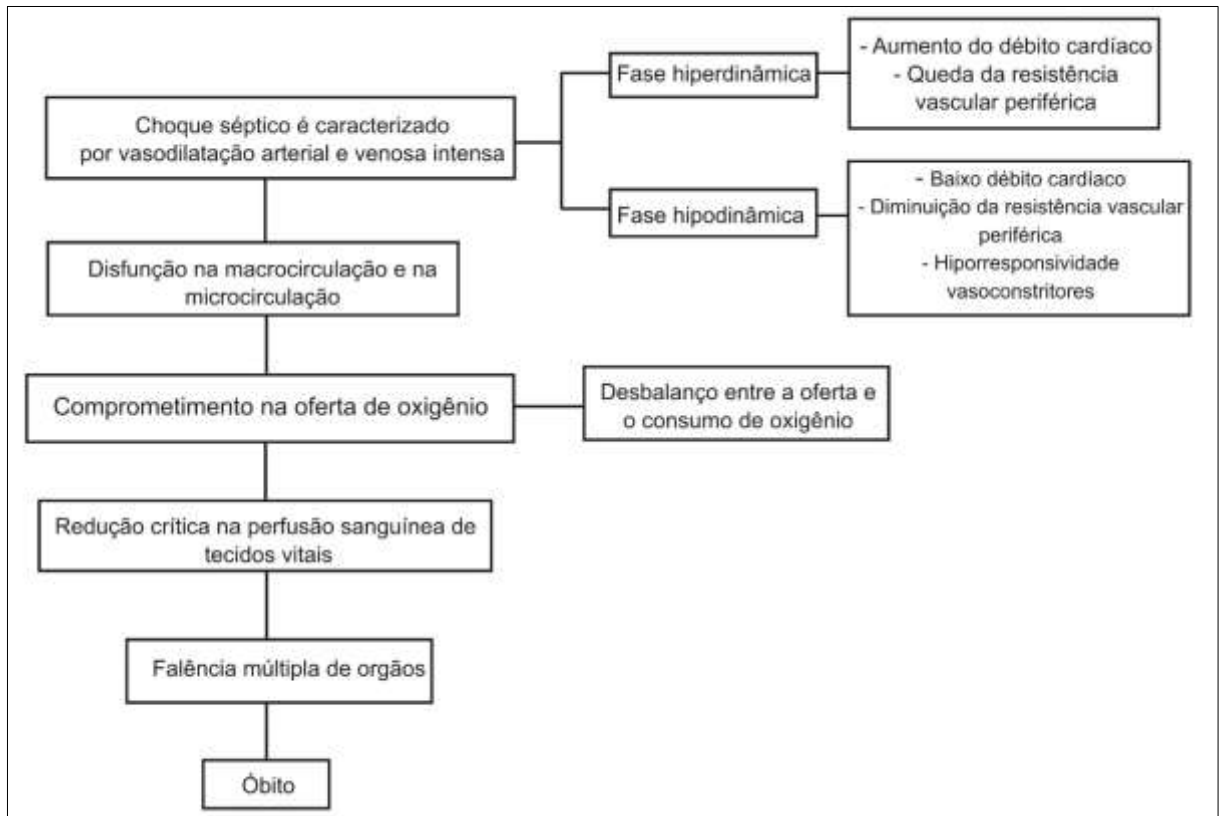
Cem mil quilômetros de vasos sanguíneos se conectam a cada célula viva. “Rodovias vasculares” se estreitam formando “estradas de mão única”. Em seguida, formam “ciclovias”, então “trilhas”, até que finalmente os glóbulos vermelhos saem de soslaio e avançam lentamente por um vaso capilar da espessura de um fio de cabelo (DE SOUZA, 2010).

O sistema vascular é composto principalmente pela aorta e suas ramificações primárias, priorizando o fluxo sanguíneo para a metade proximal do corpo, onde se encontram estruturas como o encéfalo e o sistema cardiorrespiratório central. Desse modo, órgãos vitais localizados na cabeça, pescoço e parte proximal do tórax podem ser perfundidos com maior pressão e com um ótimo fluxo sanguíneo. As artérias são vasos eferentes em relação ao coração, e diminuem de calibre à medida que se ramificam distalmente com término nos vasos capilares, aonde acontece a troca de gases. Ao deixar os capilares sistêmicos o sangue entra nas veias sistêmicas que conduz produtos do metabolismo celular, através da qual ele flui em vasos que vão aumentando de tamanho em um sistema de drenagem cada vez mais calibroso, em direção ao coração através do átrio direito (DE SOUZA, 2010).

Os vasos sanguíneos desempenham um papel importante no controle da pressão arterial sistêmica e no fluxo de sangue ao interferir na resistência à passagem

de sangue (PETERSON.,1960). São constituídos por camadas, sendo elas: a túnica íntima formada por uma camada de células endoteliais que ficam em contato direto com o lúmen do vaso. No passado, a função atribuída ao endotélio era apenas como uma barreira à difusão de macromoléculas a partir do lúmen do sangue para o espaço intersticial. No entanto, com o passar do tempo vários papéis foram atribuídos ao endotélio, como por exemplo a regulação do tônus vasomotor, através da liberação de sinais químicos como, por exemplo o óxido nítrico, o mediador mais importante secretado pelo endotélio, que promove relaxamento do músculo liso vascular (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Essa camada de células endoteliais é apoiada em uma camada de tecido conjuntivo frouxo, separada da túnica média por uma lâmina elástica interna, componente mais externo da íntima. A túnica média é constituída por camadas concêntricas de células musculares lisas organizadas helicoidalmente, entre elas existem quantidades variáveis de fibras e lamelas elásticas, fibras reticulares, proteoglicanas e glicoproteínas. As células musculares lisas estão envolvidas no controle da pressão arterial e fluxo sanguíneo, uma vez que regulam o diâmetro do vaso. Recebem inervação do sistema nervoso autônomo simpático e o estado contrátil é controlado por hormônios de ação autócrina/paracrina e sinais químicos locais. O processo celular de contração do músculo liso é regulado por receptores acoplados a uma proteína Gq heterotrimérica, no qual após a ligação do agonista (por exemplo a noradrenalina, angiotensina II e endotelina), estimula a fosfolipase C, a qual catalisa a formação de dois segundos mensageiros: inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). A ligação de IP3 a receptores no retículo sarcoplasmático resulta na liberação de cálcio para o citosol. O DAG juntamente com o cálcio ativa a proteína quinase C (PKC), que fosforila proteínas específicas. O cálcio, ao se ligar à calmodulina, conduz a ativação da cinase de cadeia leve da miosina (MLC-quinase). A cinase fosforila a cadeia leve de miosina, e, em conjunto com o ciclo de pontes cruzadas da actina, ocorre o encurtamento da célula do músculo liso (WEBB, 2003).A túnica adventícia é a última camada que compõe o vaso e consiste principalmente em colágeno do tipo I e fibras elásticas (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

A sepse é uma patologia clínica complexa que envolve diretamente o sistema cardiovascular, acarretando em uma sequência de eventos importantes que alteram o seu funcionamento, conforme descrito na (Fig.1).



**Figura 1.** Fluxograma dos eventos cardiovasculares envolvidos na fisiopatologia do choque séptico. Fonte: autor, 2015.

Dentre os mecanismos implicado na hipotensão e hiporresponsividade aos vasoconstritores na sepse se destaca a via do óxido nítrico (NO), pois há um aumento na produção de NO na sepse (MONCADA *et al.*, 1991; VICENT *et al.*, 2000). Desde a sua descoberta por Furchgott, Ignarro e Murad, os quais foram agraciados em 1998 com o prêmio Nobel de Medicina por seu papel e impacto sobre a vasculatura, o NO é reconhecido como um importante mensageiro celular e regulador do tônus vascular, além de estar envolvido em vários processos biológicos nos sistemas cardiovascular, nervoso e imune. É produzido em pequenas quantidades pela ação da enzima óxido nítrico sintase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (e-NOS e Nnos) e pela isoforma independente de  $\text{Ca}^{2+}$  (i-NOS) (MONCADA *et al.*, 1991).

Na tentativa de buscar terapias eficazes para restaurar a pressão arterial, a prática clínica foi atraída para a utilização de adrenalina e análogos adrenérgicos (WEIL; SHUBIN; CARLSON, 1975). O uso de vasoconstritores, bem como a limitação da eficácia dos mesmos em promover aumento da pressão arterial, são aspectos abordados nos itens subsequentes.

## 1.5. TERAPIA VASOPRESSORA NO CHOQUE SÉPTICO

O tratamento da sepse é guiado por diretrizes que visam fornecer orientações para o cuidado clínico de pacientes com sepse grave ou choque séptico. No documento mais recente referente ao suporte hemodinâmico e terapia adjuvante para o tratamento do choque séptico (DELLINGER *et al.*, 2013), recomenda-se que a hipotensão deve ser gerenciada inicialmente com reposição volêmica, 30 ml/Kg em bolus de terapia intravenosa com cristaloides como fluido inicial, para manter a pressão arterial média (PAM) maior ou igual a 65 mmHg, e albumina quando os pacientes exigem quantidades substanciais de cristaloides. Caso a PAM não seja reestabelecida com a ressuscitação com fluidos, a terapia vasopressora deve ser implementada. A noradrenalina é o fármaco de primeira escolha para o gerenciamento do choque séptico. Entretanto, apesar de este ser o fármaco de primeira escolha o grau de evidência para a sua utilização ainda é um (1B) (forte recomendação/moderada evidência). Se a hipotensão não for revertida a adição de adrenalina é recomendada (2B) (fraca recomendação/ moderada evidência). Ainda em terceiro na lista de opções, recomenda-se a vasopressina, que deve ser combinado com a noradrenalina com a intenção de aumentar a PAM ou diminuir a dosagem de noradrenalina. Sugere-se o uso da dopamina como alternativa à noradrenalina, porém somente em pacientes com baixo risco de arritmias ou bradicardia (2C) (baixa recomendação/ baixa evidência). A fenilefrina não é recomendada no tratamento exceto quando a noradrenalina está associada com arritmias graves; também pode ser usada como terapia de resgate quando combinada com agentes inotrópicos (1C) (forte recomendação/baixa evidência). Ainda segundo Arellano; Hanneman, (2014) as causas de morte são multifatoriais, mas existe forte evidência para sugerir que o uso de vasopressores contribui para a mortalidade geral. A seguir abordaremos aspectos farmacológicos dos vasoconstritores.

### 1.5.1. Farmacologia dos vasoconstritores utilizados na sepse

As ações da adrenalina foram descritas em 1948 por Ahlquist Raymond que a descreveu em dois receptores distintos os quais por “conveniência” denominou receptores alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) adrenotrópicos. Verificou também que o receptor  $\alpha$  estava associado em sua maior parte com as funções excitatórias (vasoconstrição,

contração do útero) e inibitórias (relaxamento intestinal), enquanto os receptores  $\beta$  estavam associados em sua maior parte com as funções inibitórias (vasodilatação, inibição da contração uterina) e uma função excitatória (estimulação do miocárdio) (RAYMOND AHLQUIST, 1948). A adrenalina é um potente estimulador de ambos os receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos, e eleva a pressão arterial por estimulação direta do miocárdio, aumentando a força de contração do ventrículo, portanto exercendo ações inotrópica e cronotrópica positivas. Além disso, através de sua interação com receptores  $\alpha_1A$  promove vasoconstrição em muitos leitos vasculares, especialmente em pequenas arteríolas e esfíncteres pré-capilares, mas também atuam em grandes artérias e veiais (GOODMAN, 2002).

Por sua vez, o cloridrato de fenilefrina é um agonista adrenérgico  $\alpha_1$  seletivo, eleva a pressão arterial por aumentar a resistência arterial em virtude da constrição em arteríolas, com praticamente nenhum efeito sobre as arteríolas terminais. Em um estudo realizado por Morelli *et al.*, (2008) em pacientes com choque séptico, sugere-se que não há diferenças da utilização de fenilefrina, comparado à noradrenalina, quanto ao desempenho cardiopulmonar, transporte de oxigênio e hemodinâmica regional.

A vasopressina (AVP), ou hormônio antidiurético, é um nano peptídeo ligado a dois aminoácidos de cisteína, sintetizada nos neurônios magnocelulares e parvocelulares do núcleo supra-óptico e paraventriculares do hipotálamo (HOLMES *et al.*, 2001). A transcrição de AVP aumenta em condições de hipertonicidade, hipotensão e ou hipovolemia. Após sua síntese a AVP é transportada para a neuro-hipófise, onde é estocada (OUDEN E COLS, 2005). Inicialmente a AVP é sintetizada como um pré- pró-hormônio, a pré-pró vasopressina, por ribossomos do retículo endoplasmático, processo que ocorre da glicosilação do peptídeo N-terminal. A vasopressina é armazenada na neuro-hipófise até que ocorra um estímulo adequado para a sua liberação. A vasopressina exerce sua ação ao atuar em receptores V1 encontrados na musculatura lisa vascular, os quais promovem vasoconstrição, e receptores V2 presentes do ducto coletor e néfron distal, que levam ao aumento de permeabilidade à água e reduzem a diurese (BIRNBAUMER, 2000).

Apesar da angiotensina II não estar entre os fármacos que são utilizados no tratamento do choque séptico, fisiologicamente o sistema renina angiotensina aldosterona desempenha um papel chave na homeostase de fluidos, eletrólitos, regulação da pressão arterial e regulação do fluxo sanguíneo (PAUL *et al.*, 2006). As

principais atividades fisiológicas da angiotensina II são mediadas por receptores AT1 acoplados a proteínas G, as quais por sua vez atuam como intermediárias na transdução de sinal (ALI; SAYESKI; BERNSTEIN, 2000). A cascata de sinalização tem início com a renina, uma aspartil protease que cliva o angiotensinogênio liberado pelo fígado para formar o decapeptídeo angiotensina I, que é clivado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), gerando o octapeptídeo angiotensina II. A angiotensina II atua no controle da pressão arterial, por liberação de aldosterona pela zona glomerulosa adrenal, reabsorção de sódio e água nas células tubulares proximais e secreção de vasopressina (LAVOIE; SIGMUND, 2003).

Estudos experimentais foram conduzidos no sentido de explorar a modulação dos diferentes vasos na sepse, no entanto esses estudos são limitados uma vez que não exploram os vasopressores comumente utilizados na clínica em humanos, ou ainda os estados iniciais e tardios da sepse (Martin *et al.*, 1993). Apesar de estabelecido o arsenal terapêutico, ainda é controversa a utilização de drogas vasopressoras, o que pode ser observado devido aos altos índices de mortalidade. Assim, em linhas gerais a hipótese do nosso trabalho é que diferentes vasos obtidos a partir de diferentes sistemas podem apresentar perfis de responsividade diferente a vasopressores endógenos e utilizados na clínica como tratamento na sepse.

## II. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a reatividade de diferentes vasos obtidos de animais submetidos ao modelo experimental de sepse induzida pela cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP), frente a agentes vasopressores endógenos (angiotensina II, vasopressina e noradrenalina), e/ou utilizados na clínica (vasopressina, noradrenalina e fenilefrina) em humanos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Padronizar o modelo experimental de sepse induzida pela cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP), tendo por base o índice de mortalidade, perda de peso, temperatura corpórea, alterações hematológicas e instalação de hipotensão arterial;
- b) Avaliar se o processo anestésico e cirúrgico realizado no grupo falso-operado altera a pressão arterial sistólica e a reatividade vascular a vasoconstritores *in vitro*;
- c) Investigar e comparar o perfil de alterações na reatividade vascular a vasoconstritores em diferentes artérias obtidas de animais com sepse induzida pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco.
- d) Avaliar a influência do tempo de progressão da sepse sobre a reatividade das artérias aos vasoconstritores em estudo.
- e) Investigar a participação do óxido nítrico produzido na artéria mesentérica durante a sepse na responsividade desse vaso a dois diferentes agonistas de receptores alfa adrenérgicos.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, com idade entre 3 e 4 meses. Os animais foram fornecidos pelo Biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia até o momento da realização dos experimentos, sob controle da temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e ciclo claro-escuro de 12/12 h controlados automaticamente. Os animais tiveram livre acesso à água e ração até o momento dos experimentos. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal do Paraná (protocolo 2375.005994/2014-96/PR), e pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo PP 00566).

#### 3.2. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

##### 3.2.1. Indução da sepse: Modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP)

O modelo de sepse utilizado para a realização deste trabalho foi o de ligadura e perfuração do ceco (CLP, do Inglês *cecal ligation and puncture*), o qual foi descrito em 1980 (Wichtermann, Baue e Chaudry, 1980). Para isto, os animais foram sedados e analgesiados por meio de aplicação de xilazina e tramadol nas dosagens de 5 e 10 mg/kg (i.p), respectivamente. Após 5 minutos, os animais foram anestesiados em câmara anestésica saturada com mistura de isoflurano (aproximadamente 5%) e oxigênio a 100%, seguido pela manutenção anestésica via máscara facial e respiração espontânea com mistura de isoflurano (3%) e oxigênio a 100%. Após a confirmação da ausência de reações a estímulos externos de pinçamentos das patas e cauda, os animais receberam infiltrações subcutâneas na linha alba (local da incisão cirúrgica) do anestésico local lidocaína (2%, sem vasoconstritor), no volume final de 200 µL para cada sítio de infiltração. Após, foi realizada uma laparotomia de aproximadamente 1 cm para localização e exposição do ceco. O ceco foi ligado com fio de sutura (sem obstrução total) na região mediana, e quatro furos foram feitos com uma agulha de 18 gauge, seguido de compressão para extravasamento do conteúdo intestinal. O ceco



foi realocado no peritônio do animal e a cavidade abdominal suturada (AutoClip®, Mikrón, Inc., Gardena, CA, EUA). Os animais receberam salina (30 ml/kg, s.c.), a qual foi administrada imediatamente após o procedimento cirúrgico, para reposição de volume. Uma nova injeção de cloridrato de tramadol na dose de (10 mg/kg, s.c.) foi administrada 12 h após o procedimento cirúrgico. Os animais do grupo falso-operado foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, contudo sem a perfuração e ligadura do ceco.

#### 3.2.2. Avaliação da sobrevida

Para avaliação do grau de letalidade do modelo, grupos de animais submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco de animais falso-operados foram mantidos sob observação por um período de 96 h, durante o qual as mortes foram contabilizadas nos tempos de 3, 6, 24, 36 48 e 96 h após o procedimento cirúrgico.

#### 3.2.3. Avaliação do peso corpóreo

O peso dos animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco, bem como de animais falso-operados, foi avaliado em balança digital antes e nos tempos de 3, 6, 24, 36, 48, 72 e 96 h após os procedimentos cirúrgicos (grupos CLP ou falso-operados).

#### 3.2.4. Avaliação da temperatura corpórea

A temperatura corpórea foi avaliada com termômetro de mercúrio nos grupos de animais submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco, falso operado e naive. Antes do início dos experimentos os animais foram ambientados em sala com temperatura controlada ( $21 \pm 1$  °C). A temperatura foi avaliada com a introdução do termômetro no reto do animal. Foram realizadas medidas basais no dia anterior ao início dos experimentos. A temperatura retal foi avaliada nos tempos de 6, 24, e 48 h após a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco, sendo os resultados expressos em °C.

### 3.2.5. Dosagens hematológicas

Dosagens hematológicas foram realizadas em sangue coletado de animais pertencentes aos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h. As amostras foram obtidas de animais utilizados nos experimentos *in vitro* descritos no item 3.3. Para a coleta do sangue os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), administradas por via intraperitoneal (i.p.) e, após ausência de resposta a estímulos dolorosos, foi realizada uma laparotomia torácica com exposição da veia cava superior. A veia cava foi puncionada e 1 ml de sangue foi coletado em seringa e imediatamente transferido a tubos contendo 40 µL de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA 5%). A análise hematológica foi feita por contador automatizado (modelo Horiba, ABX®, Micros 60; Montpellier, França). Os resultados foram expressos em quantidade de células/µL, ou em % para o hematócrito.

### 3.2.6. Avaliação da pressão arterial sistólica em ratos acordados

A medida da pressão arterial foi realizada nos grupos CLP, falso operado e naive pelo método de medida indireta na cauda, através de pletismometria, também conhecido como *tail-cuff*. Para isso os animais foram acondicionados na sala de experimentação com temperatura controlada (30 °C) por 30 minutos antes do início dos procedimentos. Neste modelo, a permanência em ambiente aquecido é fundamental para permitir a detecção do fluxo sanguíneo na cauda dos animais pelo pletismógrafo. Após esse período os animais foram colocados em tubo cilíndrico de acrílico para contenção, e acomodados sobre uma placa aquecida. Respeitado um intervalo de 10 minutos para adaptação do animal à imobilização, o transdutor (modelo LE5160R, Panlab, Espanha), previamente calibrado, foi colocado na cauda do animal. Esse transdutor é conectado a um esfigmomanômetro dotado de sistema de insuflação automatizado, o qual é acoplado a um sistema de captação (modelo ML125 NIBP) e de conversão dos dados (PowerLab 8/35), conectado a um computador e software específico de aquisição de dados (LabChart v.7.1; todos da AD Instruments, Austrália). Em conjunto, este sistema permite o registro da pressão arterial sistólica (PAS) e da frequência cardíaca dos animais. Em nossos experimentos, cada avaliação consistiu na realização de cinco medidas da PAS por animal. A média dos valores registrados foi considerada como a PAS do ponto mensurado. A PAS dos

animais foi avaliada antes, e nos tempos de 3, 6, 18 e 24 horas após o procedimento cirúrgico (grupos CLP e falso-operado). Os resultados foram expressos em mmHg e a média dos valores obtidos foi comparada entre os grupos experimentais.

### 3.3. PREPARAÇÕES ISOLADAS: EXPERIMENTOS IN VITRO

#### 3.3.1. Técnica de remoção e montagem de vasos em cubas de órgão isolado

Antes do procedimento para retirada dos vasos os animais foram eutanasiados com overdose anestésica de cetamina/xilazina (dose acima 140/30 mg/kg, i.p., respectivamente) e secção de grandes vasos. Após, as artérias, mesentérica superior, caudal, carótida e artéria renal foram localizadas e cuidadosamente dissecadas. Para a dissecação da artéria mesentérica superior, primeiro retirou-se todo o leito mesentérico, no qual, o mesmo foi colocado em placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit (concentrações, em mM: NaCl 131,3, KCl 4,7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,18,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,17,  $\text{NaHCO}_3$  14,9, Dextrose 5,5,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,6, EDTA 0,08) e a artéria mesentérica superior foi localizada e cuidadosamente dissecada e retirada.

Para o isolamento da artéria carótida, a traqueia, foi exposta e a artéria carótida localizada e dissecada do nervo vago antes de ser cuidadosamente removidos do animal. Para o isolamento da artéria renal, primeiro localizou-se a aorta e as ramificações da artéria renal, que foram dissecadas e cuidadosamente removida do animal. Para o isolamento da artéria caudal, primeiro realizou-se um corte com bisturi para a retirada da pele e localização da artéria caudal, a qual foi dissecada e retirada do animal. Após o isolamento dos tecidos, os mesmos foram acondicionados em placas de Petri contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit e os tecidos conectivos removidos. Em seguida, as artérias foram seccionadas em anéis de 1-2 mm de comprimento e colocadas em banho de órgãos modelo (modelo EZ-NeWMyo-4TB™) acoplados a transdutores de força (modelo i-FOT 50SW) e amplificador (modelo BRAM-4B; todos da GlobalTown Microtech, Inc., Sarasota, FL, EUA). O sistema foi conectado a um polígrafo computadorizado (PowerLab 4/30®) e software de integração e registro (LabChart® Pro v. 7.3.3 ambos da AD Instruments, Austrália).

Durante todo o protocolo experimental descrito a seguir, as artérias foram mantidas em cubas de vidro (com capacidade máxima para 5 ml) contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit sob temperatura constante de 37 °C, e sob

borbulhamento com mistura carbônica (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>). As preparações foram submetidas a uma tensão basal de 0,5 g (no caso da artéria mesentérica superior, artéria renal e artéria caudal), e 1 g (no caso da artéria carótida), a qual foi mantida ao longo de todo o experimento. Antes do início de qualquer avaliação de reatividade as preparações permaneceram em repouso durante 60 min para garantir a estabilização das mesmas no sistema. Durante esse período o líquido nutritivo foi trocado em intervalos de 15 minutos.

Após o período de estabilização as preparações foram expostas a solução nutritiva modificada contendo 120 mM de cloreto de potássio e a contração induzida foi registrada. Posteriormente as preparações foram lavadas com Krebs-Henseleit por três vezes, seguindo-se um novo período de estabilização de 30 minutos, trocando-se o líquido nutritivo em intervalos de 15 minutos. Uma nova contração foi induzida com 1 µM de fenilefrina, seguida da administração de 1 µM de acetilcolina (no caso da artéria carótida) ou 10 µM (no caso das artérias renal, caudal e mesentérica superior), durante o platô de contração da fenilefrina. A capacidade da acetilcolina em relaxar as preparações foi utilizada como parâmetro para a confirmação da presença de endotélio funcional. Os anéis que alcançaram um relaxamento igual ou superior a 80% foram considerados com endotélio funcional, sendo que somente preparações com endotélio funcional foram utilizadas neste estudo. Os resultados obtidos foram expressos em gramas de contração.

### 3.3.2. Investigação da responsividade vascular à fenilefrina e noradrenalina em animais falso operados

Com a finalidade de investigar o efeito do procedimento cirúrgico e anestésico no grupo falso operado, avaliamos a reatividade vascular da artéria mesentérica superior a concentrações crescentes de fenilefrina (1 nM a 100 µM) e noradrenalina (1 nM a 100 µM). Os anéis de artéria mesentérica foram expostos a concentrações cumulativas de fenilefrina ou noradrenalina, a qual foi comparada com os efeitos registrados em preparações obtidas do grupo controle (naive).

### 3.3.3. Investigação da responsividade vascular a vasoconstritores na sepse

#### 3.3.3.1. *Artéria Mesentérica*

A artéria mesentérica superior dos grupos submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco e grupo controle foi utilizada nos experimentos de reatividade. As preparações foram realizadas conforme protocolo experimental descrito no item 3.3.1. Após um novo período de estabilização de 30 minutos, foi construída uma curva concentração-resposta com os seguintes vasoconstritores: noradrenalina (1 nM a 100  $\mu$ M), fenilefrina (1 nM a 100  $\mu$ M) angiotensina II (1 nM a 3  $\mu$ M) e vasopressina (1 nM a 3  $\mu$ M). Foram avaliadas a resposta máxima induzida ( $E_{max}$ ) e a concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo ( $CE_{50}$ ) da capacidade de resposta a esses agentes na sepse, que foram comparados aos valores obtidos no grupo controle.

#### 3.3.3.2. *Artéria Carótida*

A artéria carótida dos grupos submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco e grupo controle foi utilizada nos experimentos de reatividade. As preparações foram realizadas conforme protocolo experimental descrito no item 3.3.1. Após um novo período de estabilização de 30 minutos, foi construída uma curva concentração-resposta com os seguintes vasopressores: noradrenalina (1 nM a 100  $\mu$ M), fenilefrina (1 nM a 100  $\mu$ M), angiotensina II (1 nM a 3  $\mu$ M) e vasopressina (1 nM a 3  $\mu$ M). Após, foi realizada uma avaliação comparativa da  $E_{max}$  e  $CE_{50}$  desses agentes na sepse, e os valores obtidos comparados ao grupo controle.

#### 3.3.3.3. *Artéria Renal*

A artéria renal dos grupos submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco e grupo controle foi utilizada nos experimentos de reatividade. As preparações foram realizadas conforme protocolo experimental descrito no item 3.3.1. Após um novo período de estabilização de 30 minutos, foi construída uma curva concentração-resposta com os seguintes vasopressores: noradrenalina (1 nM a 100  $\mu$ M), fenilefrina (1 nM a 100  $\mu$ M) angiotensina II (1 nM a 1  $\mu$ M) e vasopressina (1 nM a 30  $\mu$ M). Após,

foi realizada uma avaliação comparativa das  $E_{\max}$  e  $CE_{50}$  desses vasoconstritores que foram comparados aos valores obtidos no grupo controle.

#### 3.3.3.4. *Artéria Caudal*

A artéria caudal dos grupos submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco e grupo controle foi utilizada nos experimentos de reatividade. As preparações foram realizadas conforme protocolo experimental descrito no item 3.3.1. Após um novo período de estabilização de 30 minutos, foi construída uma curva concentração-resposta com os seguintes vasopressores: noradrenalina (1 nM a 100  $\mu$ M), fenilefrina (1 nM a 100  $\mu$ M) angiotensina II (1 nM a 3  $\mu$ M) e vasopressina, (1 nM a 3  $\mu$ M). Após, foi realizada uma avaliação comparativa das  $E_{\max}$  e  $CE_{50}$  desses vasoconstritores que foram comparados aos valores obtidos no grupo controle.

#### 3.3.4. Avaliação do bloqueio da enzima óxido nítrico sintases na reatividade da artéria mesentérica

Com base em resultados obtidos nos experimentos descritos nas etapas anteriores deste estudo, avaliamos a influência de inibidores da NO sintase sobre a responsividade vascular da artéria mesentérica superior, oriunda de animais submetidos à CLP, frente aos vasoconstritores fenilefrina e noradrenalina. Para isso, após obtenção das preparações, confirmação do endotélio funcional nas mesmas, e demais etapas descritas no item 3.3.1, as preparações foram incubadas com L-NAME (100  $\mu$ M), um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, ou 1400W (10  $\mu$ M), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico induzida, por um período de 30 minutos. Após, o período de estabilização avaliamos a responsividade vascular à fenilefrina (1 nM a 100  $\mu$ M) e noradrenalina (1 nM a 100  $\mu$ M) em anéis pré incubados com L-NAME ou 1400W, obtidos do grupo controle (veículo krebs), controle (L-NAME ou 1400W), CLP 6 h (L-NAME ou 1400W), CLP 6 h (veículo Krebs), CLP 18 h (L-NAME ou 1400W) CLP 18 h (veículo Krebs). Cada anel de artéria mesentérica foi incubado somente com um inibidor, e exposto somente à resposta de um vasoconstritor. Os resultados foram expressos em g de contração sendo avaliadas a  $E_{\max}$  e  $CE_{50}$ , para fins de comparação entre os grupos.

### 3.4. DROGAS E SAIS

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas e sais: isoflurano (Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil); cloridrato de xilazina 2% (VetBrands, Jacareí, São Paulo, Brasil); cloridrato de cetamina 10% (Syntec, Cotia, São Paulo, Brasil); cloridrato de lidocaína e cloridrato de tramadol 5% (ambos da Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), dihidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), D-glucose, EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), fenilefrina, noradrenalina, angiotensina II, vasopressina, N- $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), acetilcolina, e 1400W, (todos da Sigma, St. Louis, MO, EUA).

### 3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (n= 5-10 animais em cada grupo). Os gráficos e as análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism versão 6.0 g (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Foi considerado significativamente significativo um valor de  $p < 0,05$ .

## IV. RESULTADOS

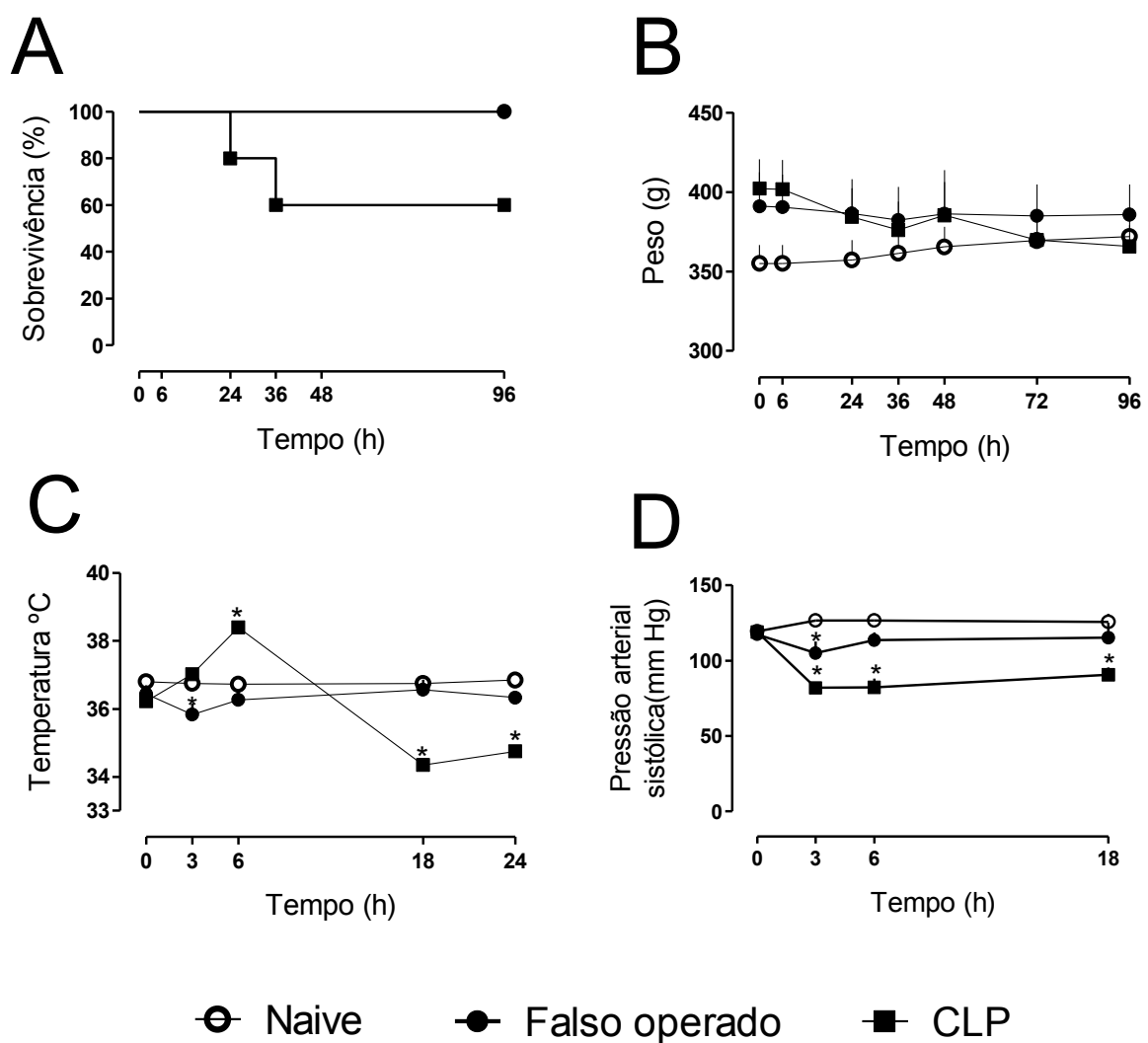
### 4.1. CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE

Uma curva de sobrevida foi realizada para padronização do modelo experimental e escolha dos tempos pós sepse a serem trabalhados. A cirurgia de ligadura e perfuração do ceco realizada neste estudo resultou em uma taxa de mortalidade de 40%, como pode ser observado na Fig. 2A. É interessante destacar que as mortes ocorreram após a 18<sup>a</sup> h e até a 35<sup>a</sup> h após a CLP. Esse experimento foi repetido mais de uma vez com a finalidade de padronizar a técnica. Um dado importante obtido nessa fase inicial do estudo foi que a morte dos animais do grupo CLP não pôde ser associada a variações significativas no peso dos animais, não estando, por exemplo, associada a eventos envolvendo desidratação (Fig. 2B). Ao avaliar a temperatura corpórea basal dos grupos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco, controle e falso operado não foi observado diferenças entre eles. Entretanto, na fase inicial do processo séptico, 6 h após a CLP, os animais apresentaram um aumento significativo na temperatura corpórea de  $36,2^{\circ}\text{C} \pm 0,15^{\circ}\text{C}$  para  $38,4^{\circ}\text{C} \pm 0,20^{\circ}\text{C}$ . Curiosamente, quando avaliamos a temperatura 18 h após a CLP observamos uma hipotermia  $34,3^{\circ}\text{C} \pm 0,35^{\circ}\text{C}$ . Em nossos experimentos o grupo controle não apresentou qualquer alteração na temperatura. O mesmo perfil de resposta encontrado no grupo controle foi observado no grupo falso operado, com exceção ao tempo 3 h após o processo cirúrgico, no qual, a temperatura foi reduzida para  $35,8^{\circ}\text{C} \pm 0,33^{\circ}\text{C}$  frente a  $36,7^{\circ}\text{C} \pm 0,10^{\circ}\text{C}$  no grupo controle. Cabe destacar que essa redução na temperatura no grupo falso operado pode ser devido ao processo anestésico e cirúrgico, visto que na 6<sup>a</sup> h após a cirurgia os valores retornam à média basal de  $36,2^{\circ}\text{C} \pm 0,26^{\circ}\text{C}$  (Fig. 2C).

Quando avaliada a pressão arterial sistólica basal dos grupos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco, falso operado e controle é observado que não há diferenças entre eles ( $118,7 \pm 7,8$ ,  $117,2 \pm 4,4$ ,  $119,3 \pm 4,2$  mmHg, respectivamente). Entretanto, ao avaliar os tempos subsequentes no grupo submetido a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco 3 h (PAS:  $81,8 \pm 3,3$  mmHg), 6 h (PAS:  $81,8 \pm 3,3$  mmHg) e 18 h ( $90,5 \pm 4,7$  mmHg), comparado aos grupos controle 3 h (PAS:  $126,6 \pm 4,6$  mmHg), 6 h ( $126,6 \pm 4,6$  mmHg) e 18 h ( $125,6 \pm 5,4$  mmHg) e falso operado



nos tempos 3 h ( $104,8 \pm 7,8$  mmHg), 6 h ( $113,6 \pm 4,8$  mmHg) e 18 h ( $115,0 \pm 10,0$  mmHg), é observado que o grupo CLP apresenta hipotensão significativa. Um detalhe importante a ser mencionado é que estes animais apresentaram hipotensão mesmo recebendo reposição volêmica após a cirurgia. Ao avaliar a pressão arterial do grupo submetido a falsa cirurgia no grupo controle é observado que este apresentou redução na pressão sistólica 3 h após a cirurgia. Como mencionado acima, isso pode ser decorrente do processo anestésico, visto que na 6<sup>a</sup> h retorna a valores basais (Fig. 2D).



**Figura 2. Padronização do modelo experimental de sepse induzida pelo modelo de cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.** Avaliação da taxa de letalidade (A), peso (B), temperatura (C) e pressão arterial sistólica (D) (n= 5-10) por grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste de variância (ANOVA) de duas vias seguida dos pós teste de Tukey. \* Indica  $p < 0,05$  em comparação com o grupo controle.

#### 4.2. DOSAGENS HEMATOLÓGICAS

Os animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco apresentaram diferenças hematológicas características do modelo experimental de sepse, como plaquetopenia e linfocitopenia nos tempos 6 h e 18 h após o processo cirúrgico. Além disso, houve um aumento significativo no número de granulócitos 18 h após a cirurgia (Tabela 1). Além de todos estes parâmetros avaliados os animais submetidos à CLP apresentaram sinais clínicos de sepse como, prostração, atonia muscular, piloereções e secreção de porfirina, como descrito na literatura, o que não foi observado nos grupos falso operado e controle.

#### 4.3. RESPOSTA CONTRÁTIL A VASOCONSTRITORES EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE ANIMAIS SUBMETIDOS A FALSA CIRURGIA NÃO DIFERE DO NAIVE

Tendo como base esse primeiro conjunto de experimentos caracterizando nosso modelo experimental, como a curva de sobrevivência, dados da temperatura corpórea, hemograma e hipotensão arterial, definimos os tempos de 6 h e 18 h como pontos a serem investigados no decorrer do trabalho. Assim, nosso próximo passo foi investigar se o processo anestésico e cirúrgico influenciaria na responsividade vascular da artéria mesentérica do grupo falso operado, comparado ao grupo naïve, quando expostos a concentrações crescentes de fenilefrina e noradrenalina. Por isso, avaliamos e comparamos a responsividade vascular da artéria mesentérica do grupo falso operado com vasos do grupo naïve.

Anéis de artéria mesentérica superior do grupo controle e falso operado, quando expostos a concentrações cumulativas de fenilefrina e noradrenalina, apresentaram um aumento do tônus vascular dependente da concentração do agonista. Ao avaliar a responsividade do grupo falso operado à fenilefrina e à noradrenalina, em comparação com o grupo controle, observou-se que  $E_{max}$  permaneceu inalterada, bem como a  $CE_{50}$  (Fig. 3 A.B). Além disso, a contração induzida pelo KCl (120 mM) não diferiu entre os grupos estudados (Fig. 3C). Sendo assim e com base nos resultados encontrados em trabalhos anteriores do nosso laboratório (DE SOUZA, 2014), nos experimentos realizados a partir desta etapa do estudo utilizou-se o grupo naïve como “controle”.

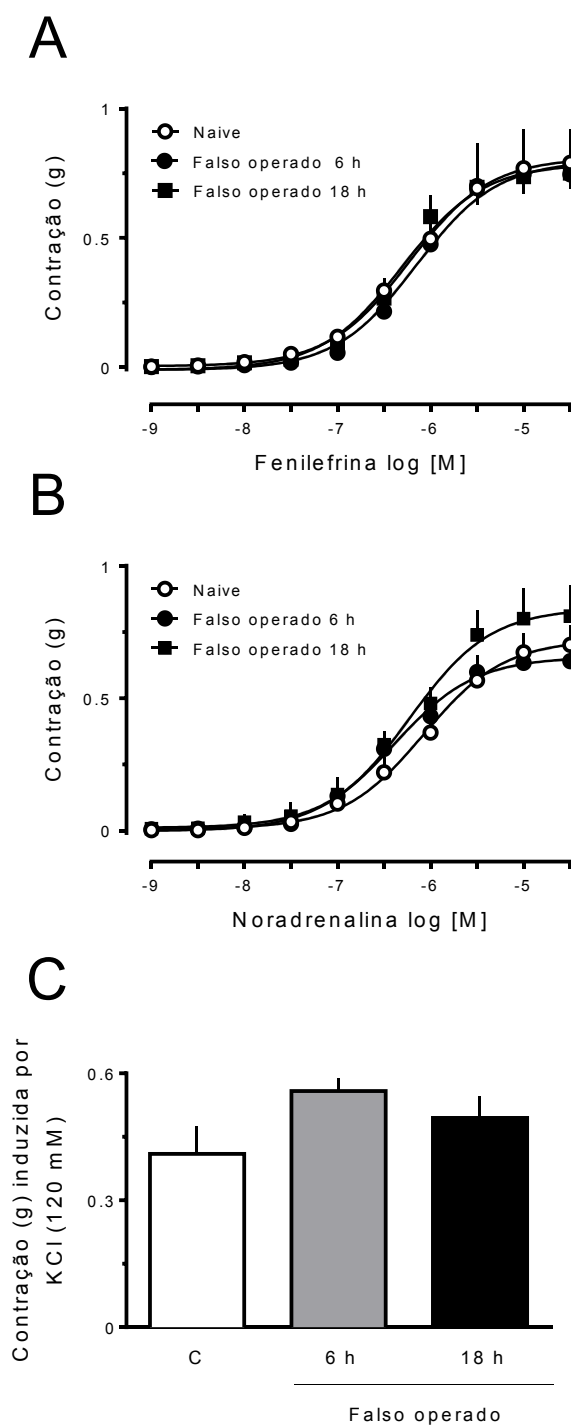
#### 4.4. VASOS DE ANIMAIS SUBMETIDOS A CIRURGIA DE LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO NÃO APRESENTAM REDUÇÃO NA CONTRAÇÃO INDUZIDA PELO KCl

A adição de KCl (120 mM) induziu uma contração sustentada em todos os grupos experimentais avaliados. Anéis de artéria mesentérica superior, assim como as artérias renal, carótida e caudal dos grupos submetido à CLP não apresentaram redução na contração induzida pelo KCl comparado ao grupo controle (Fig. 4).

**Tabela 1.** Alterações hematológicas do grupo submetido à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.

	Naive	CLP 6 h	CLP 18 h
<i>Hemoglobina</i> ( $10^3/\mu\text{L}$ )	13,08 $\pm$ 0,2	12,86 $\pm$ 1,3	15,14 $\pm$ 0,5
<i>Hematócrito</i> (%)	47,10 $\pm$ 1,1	51,30 $\pm$ 2,4	45,04 $\pm$ 2,4
<i>Plaquetas</i> ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1027 $\pm$ 51,2	700 $\pm$ 122,4*	741,8 $\pm$ 60,7*
<i>Linfócitos</i> ( $10^3/\mu\text{L}$ )	8,18 $\pm$ 1,0	1,8 $\pm$ 0,1*	1,6 $\pm$ 0,4*
<i>Monócitos</i> ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1,41 $\pm$ 0,2	1,18 $\pm$ 0,1	0,94 $\pm$ 0,1
<i>Granulócitos</i> ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1,05 $\pm$ 0,2	1,56 $\pm$ 0,38	5,50 $\pm$ 1,9*

Resultados expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média ( $n= 4-6$ ). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo pós teste de Dunnett. \*  $p < 0,05$  comparado com o naive.



**Figura 3. Reatividade vascular do grupo falso operado não difere do naive.** Em anéis de artéria mesentérica superior provenientes do grupo falso operado 6 h e 18 h foi avaliada a responsividade vascular à fenilefrina (A) e noradrenalina (B) ( $n = 4-6$ ). Não há diferenças na contração induzida por KCl (120 mM) ( $n=4-6$ ) dos grupos submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco, comparado ao grupo controle (Fig. C). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média. A análise estatística foi realizada pelo teste de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós teste de Tukey.

**Tabela 2.** Reatividade vascular da artéria mesentérica superior dos grupos naive e submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.

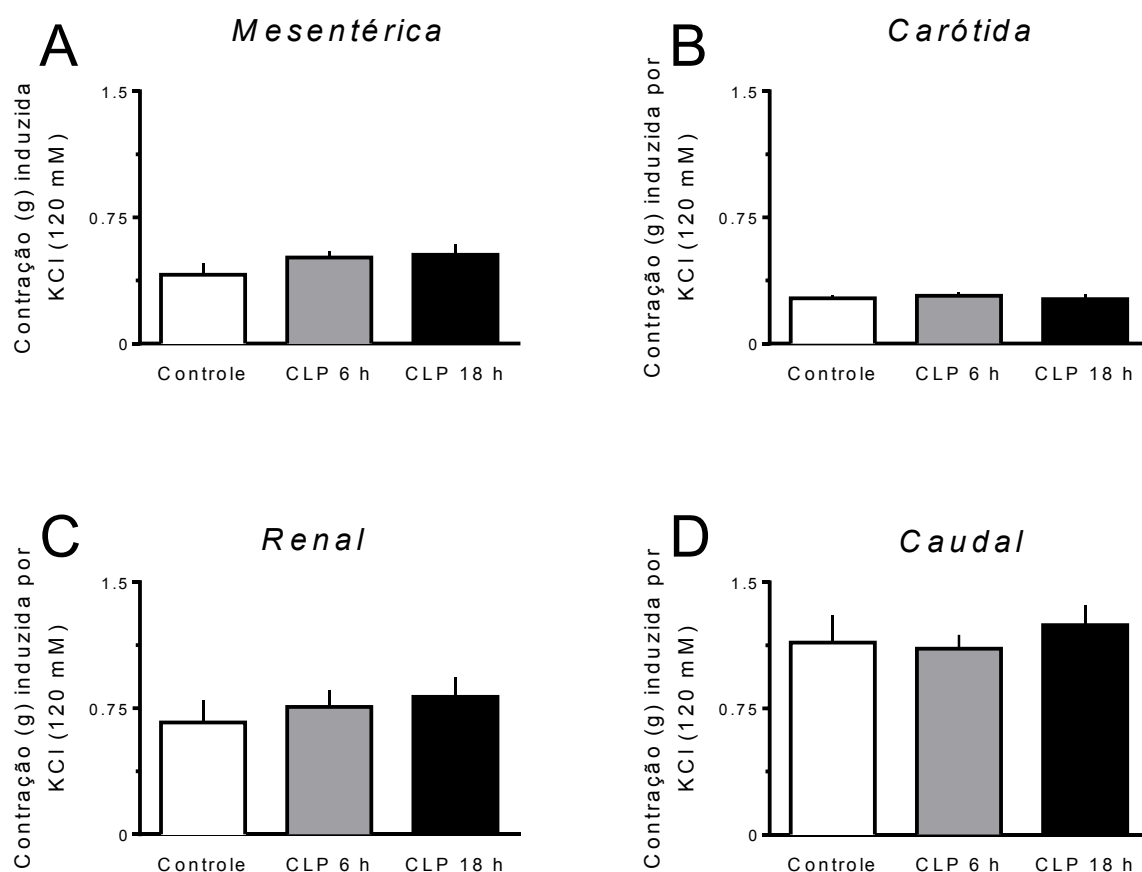
	Fenilefrina	Noradrenalina
<b>Naive</b>		
Emax (g)	0,8 ± 0,04	0,72 ± 0,03
CE50 (µM)	0,58 (0,3 - 1,05)	0,84 (0,50 - 1,4)
<b>Sham 6h</b>		
Emax (g)	0,79 ± 0,06	0,65 ± 0,03
CE50 (µM)	0,70(0,29 - 1,65)	0,40 (0,24 - 0,67)
<b>Sham 18h</b>		
Emax (g)	0,78 ± 0,03	0,83 ± 0,04
CE50 (µM)	0,49 (0,38 - 0,74)	0,59 (0,33 - 1,07 )

Emax = Efeito máximo contrátil. CE<sub>50</sub> = Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo. As artérias mesentéricas foram obtidas do grupo naive e grupo submetidos a falsa cirurgia nos tempos 6 h e 18 h após o processo cirúrgico teve sua reatividade vascular avaliada para concentrações crescentes de agentes vasoativos. As análises estatísticas foram realizadas por meio de ANOVA de duas vias seguida de Tukey.

#### 4.5. INFLUÊNCIA DA SEPSE NA REATIVIDADE VASCULAR DA ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR A VASOCONSTRITORES

A exposição da artéria mesentérica superior do grupo controle para concentrações cumulativas de fenilefrina, noradrenalina, angiotensina II ou vasopressina resultou em um aumento do tônus vascular dependente da concentração do agonista (Fig. 5AD; círculos abertos). Dentre os vasoconstritores testados em nossos experimentos a angiotensina II foi o menos eficaz, entretanto, quando avaliada a CE<sub>50</sub>, mostrou-se o mais potente dos vasoconstritores testados no grupo controle, seguido pela vasopressina (Tabela 3). Apesar de não haver diferença de resposta na contração induzida pelo KCl (120 mM), como mostrado na (Fig. 4), anéis de artéria mesentérica superior obtidas do grupo submetido a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco, grupos 6 h e 18 h, apresentaram reduções significativas

na  $E_{max}$  e aumento da  $CE_{50}$  para a fenilefrina e angiotensina II (Fig. 5<sup>a</sup> e C respectivamente; Tabela 1). Curiosamente, ao avaliar a responsividade em anéis de artéria mesentérica superior para a noradrenalina (Fig. 5B) e vasopressina (Fig. 5D), estas apresentaram  $E_{max}$  inalteradas, diferente do que encontramos para angiotensina II e fenilefrina.



**Figura 4. Reatividade inalterada ao KCl em artérias de ratos submetidos ao modelo de ligadura e perfuração do ceco.** O aumento do tônus vascular induzido por KCl 120 mM foi avaliado em anéis de artérias mesentérica superior (A), carótida (B), Renal (C), e caudal (D) dos grupos controle e submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (6 h e 18 h). Os valores estão expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós teste de Tukey.

#### 4.6. RESPONSABILIDADE INALTERADA EM ARTÉRIAS RENAI A VASOCONSTRITORES NA SEPSE

Artérias renais obtidas do grupo controle quando expostas a concentrações crescentes de angiotensina II apresentaram respostas significativamente menores quando comparado aos outros vasoconstritores avaliados. A fenilefrina, noradrenalina e vasopressina (em anéis de artérias renais obtidas do grupo controle) apresentaram um perfil similar de resposta quando avaliamos a eficácia e a potência. Curiosamente, nossos resultados mostram que artérias renais de animais submetidos ao modelo de ligadura e perfuração do ceco nos tempos 6 h e 18 h apresentam reatividade vascular inalterada quando expostos aos agentes vasoativos avaliados neste estudo (Fig. 6).

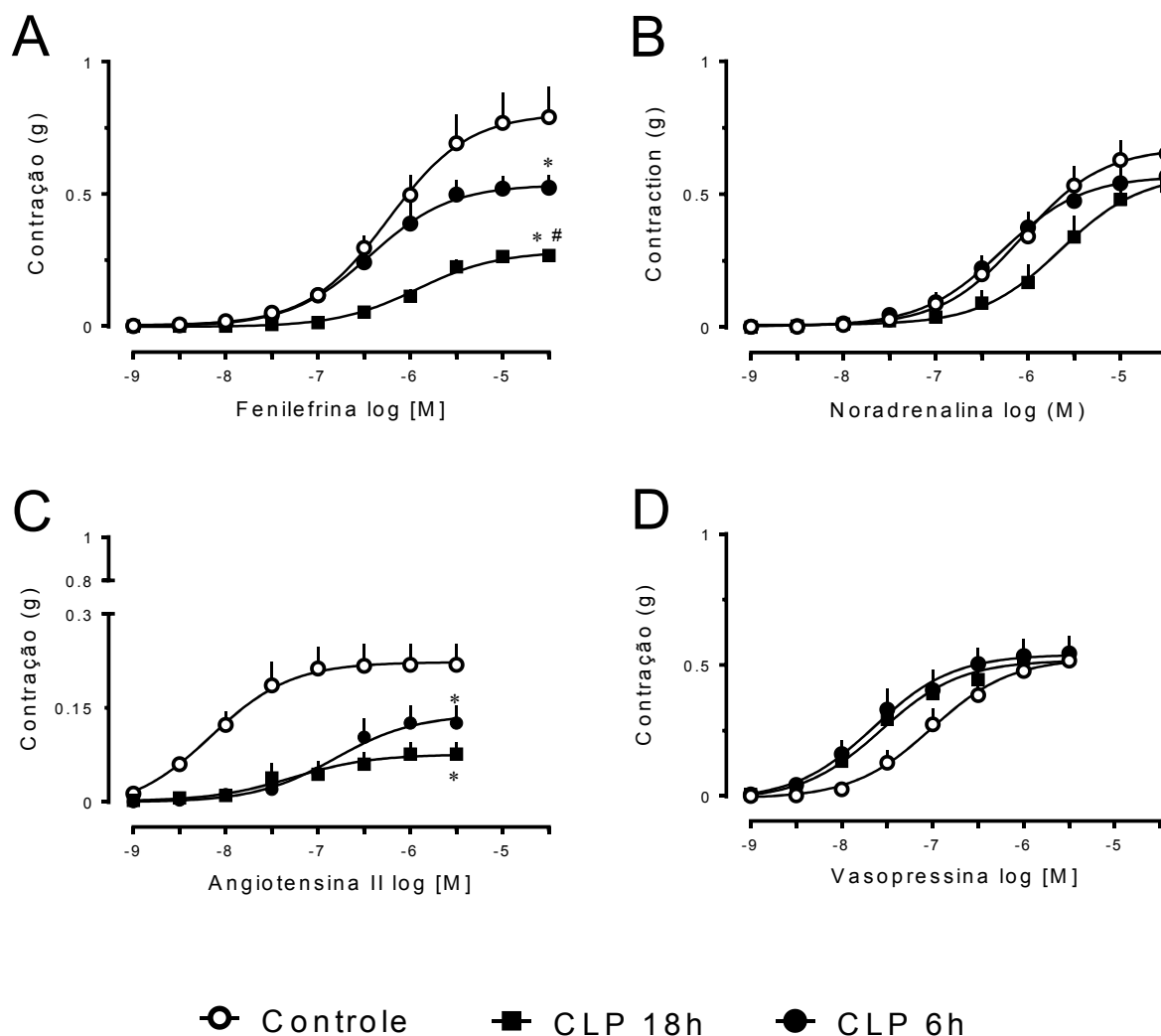
#### 4.7. AS RESPOSTAS CONTRÁTEIS A VASOCONSTRITORES ESTÃO REDUZIDAS NA ARTÉRIA CARÓTIDA DE RATOS SUBMETIDOS À CLP

Em preparações do grupo controle, a vasopressina apresentou menor eficácia (Emax menor) e menor potência (CE50 maior) do que a fenilefrina, noradrenalina e angiotensina II (Tabela 5). As artérias carótidas obtidas do grupos submetidos à CLP 18 h (Fig. 7, quadrados fechados) apresentaram redução na reatividade vascular à todos os vasoconstritores utilizados neste estudo, em comparação com vasos obtidos do grupo controle. Anéis de artéria carótida do grupo submetido à CLP 6 h expostos a concentrações crescentes de angiotensina II e vasopressina apresentaram uma capacidade em aumentar o tônus, o que não foi observado para a fenilefrina e noradrenalina.

#### 4.8. INFLUÊNCIA DA SEPSE NA RESPOSTA DA ARTÉRIA CAUDAL A VASOCONSTRITORES

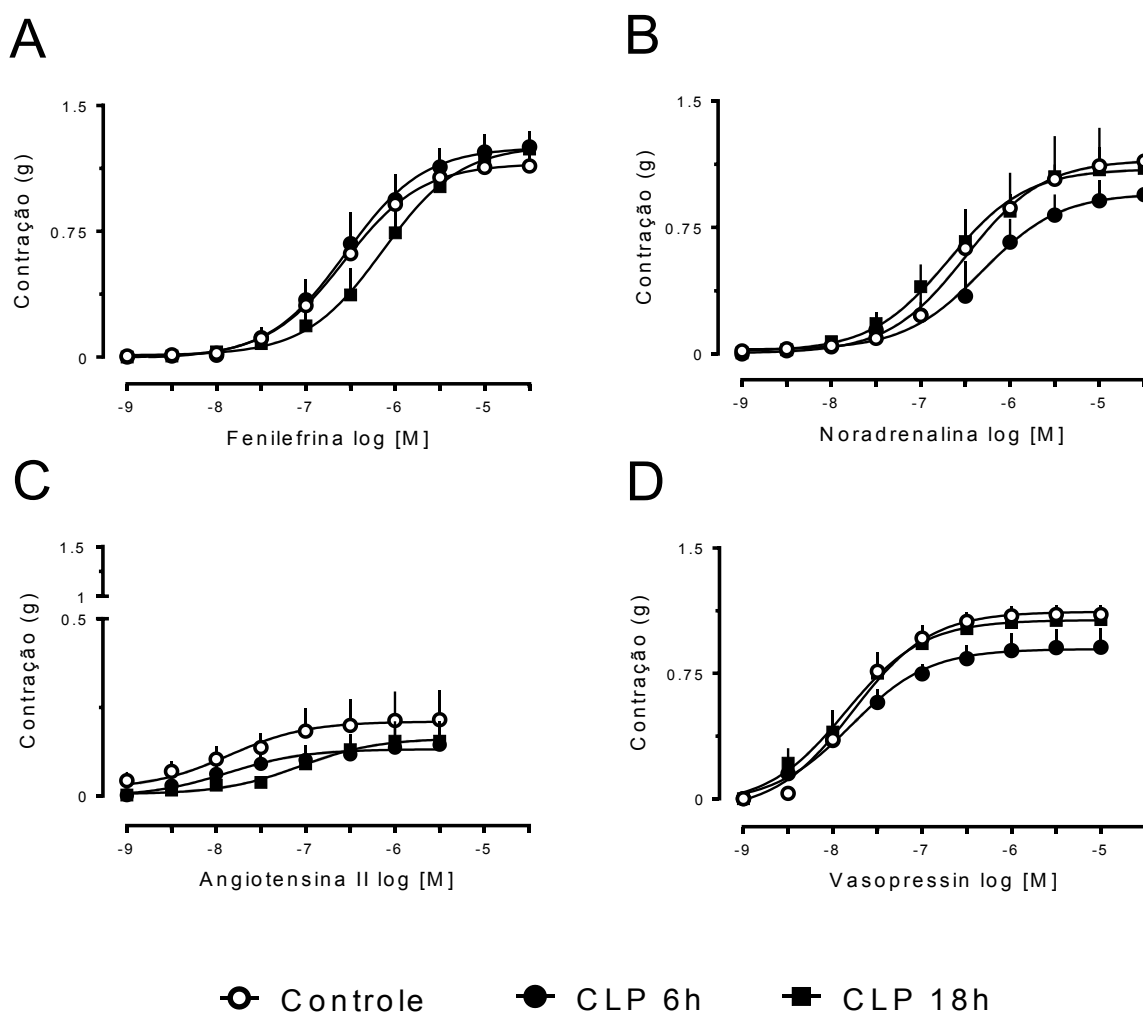
Artérias caudal do grupo controle apresentaram respostas contráteis semelhantes para a fenilefrina e noradrenalina, porém foram menos responsivas à angiotensina II e vasopressina (Fig. 8 A-D, círculos abertos). Curiosamente, apesar das preparações obtidas do grupo submetido à CLP nos tempos 6 h e 18 h

apresentarem uma  $E_{\max}$  reduzida à fenilefrina, houve aumento na  $E_{\max}$  e na potência para a noradrenalina 18 h após à CLP (Fig. 8B, Tabela 4) e vasopressina 6 h após à CLP (Fig. 8D, Tabela 4), enquanto que a responsividade à angiotensina II permaneceu inalterada.



**Figura 5. Artérias mesentéricas de ratos submetidos à CLP apresentam redução na reatividade à fenilefrina e angiotensina II, mas não para a noradrenalina e vasopressina.** As curvas concentração resposta à fenilefrina (A), noradrenalina (B), angiotensina II (C), e vasopressina (D) foram construídas em artérias mesentéricas obtidas do grupo controle e grupos CLP 6 h e 18 h após a cirurgia. Os valores mostram a média  $\pm$  erro padrão da média de  $n= 5-9$  preparações obtidas dos grupos experimentais. \* Indica  $p < 0,05$  em comparação com o controle grupo; # Indica  $p < 0,05$  comparado com o grupo CLP 6 h.





**Figura 6. Manutenção da resposta a vasoconstritores em artérias renais de ratos submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.** As curvas concentração resposta à fenilefrina (A) noradrenalina (B), angiotensina II (C), e vasopressina (D) foram construídas em artérias renais obtidas dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h. Os valores mostram a média  $\pm$  erro padrão da média de 5-9 preparações por grupo.

**Tabela 3.** Reatividade vascular da artéria mesentérica superior do grupo controle e grupo submetido à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco a vasoconstritores.

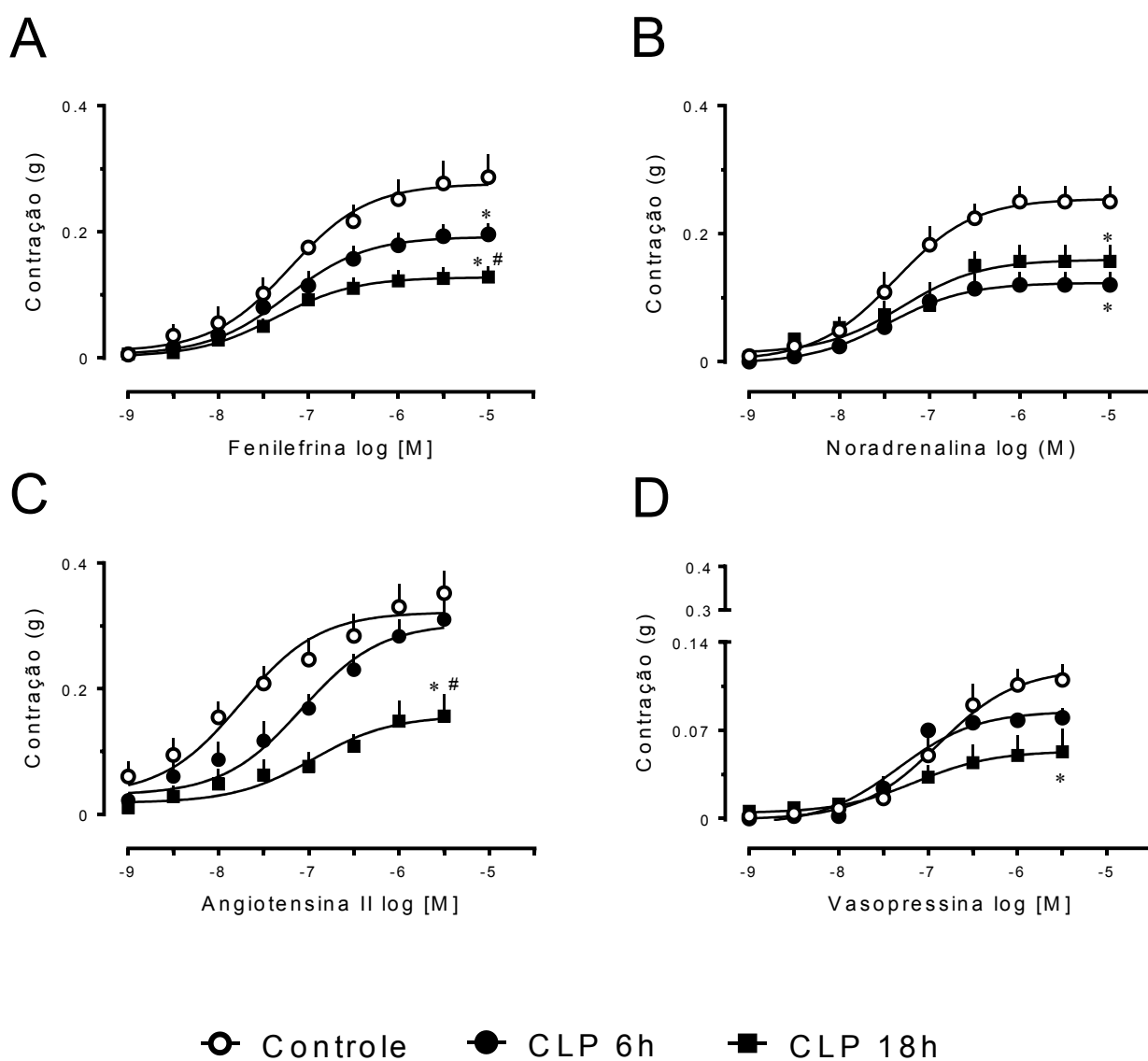
	Fenilefrina	Noradrenalina	Angiotensina II	Vasopressina
<b>Controle</b> ( <i>n</i> = 6–7)				
$E_{\max}$ (g)	$0,8 \pm 0,04$	$0,67 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,02$
$CE_{50}$ ( $\mu$ M)	0,57 (0,3 - 1,03)	0,86 (0,50 - 1,49)	0,0069 (0,0027 - 0,017)	0,09 (0,058 - 0,161)
<b>CLP 6 h</b> ( <i>n</i> = 5–9)				
$E_{\max}$	$0,53 \pm 0,02^*$	$0,56 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,01^*$	$0,53 \pm 0,03$
$CE_{50}$ ( $\mu$ M)	0,36 (0,21 - 0,61)	0,52 (0,27 - 0,97)	0,15 (0,057 - 0,409)	0,022 (0,010 - 0,048)
<b>CLP 18 h</b> ( <i>n</i> = 5–8)				
$E_{\max}$	$0,28 \pm 0,01^{*,\dagger}$	$0,57 \pm 0,04$	$0,07 \pm 0,01^*$	$0,51 \pm 0,02$
$CE_{50}$ ( $\mu$ M)	1,18 (0,78 - 1,80)	2,26 (1,15 - 4,45)	0,05 (0,01–0,24)	0,027 (0,014 - 0,051)

$E_{\max}$  = Efeito máximo contrátil.  $CE_{50}$  = Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo. As artérias mesentéricas foram obtidas do grupo controle e dos grupos submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco nos tempos de 6 h e 18 h após o processo cirúrgico e tiveram a reatividade vascular avaliada em banhos de órgãos. As análises estatísticas foram realizadas com a ANOVA de duas vias seguida de Tukey. \* Indica  $p < 0,05$  em comparação com o grupo controle. † indica  $p < 0,05$  em comparação com grupo o CLP 6 h.

**Tabela 4.** Reatividade vascular de artéria renal do grupo controle e submetido à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco a vasoconstritores.

	Fenilefrina	Noradrenalina	Angiotensina II	Vasopressina
<b>Controle</b> ( <i>n</i> = 5–8)				
$E_{\max}$ (g)	1,15 ± 0,04	1,15 ± 0,04	0,20 ± 0,03	1,11 ± 0,02
$EC_{50}$ (μM)	0,27 (0,17 - 0,42)	0,31 (0,20 - 0,48)	0,014 (0,014 - 0,13)	0,016 (0,011 - 0,023)
<b>CLP 6 h</b> ( <i>n</i> = 5–7)				
$E_{\max}$	1,24 ± 0,04	0,95 ± 0,007	0,13 ± 0,02	0,89 ± 0,03
$EC_{50}$ (μM)	0,28 (0,17 - 0,45)	0,48 (0,020 - 1,13)	0,013 (0,0013 - 0,13)	0,015 (0,0082 - 0,030)
<b>CLP 18 h</b> ( <i>n</i> = 5–9)				
$E_{\max}$	1,26 ± 0,04	1,09 ± 0,09	0,16 ± 0,02	1,06 ± 0,04
$EC_{50}$ (μM)	0,72 (0,47 - 1,12)	0,20 (0,07–0,56)	0,08 (0,018 - 0,41)	0,013 (0,0073 - 0,025)

$E_{\max}$  = Efeito máximo contrátil.  $CE_{50}$  = Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo. As artérias renais foram obtidas do grupo controle e dos grupos submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco nos tempos de 6 h e 18 h após o processo cirúrgico e tiveram a reatividade vascular avaliada em banhos de órgãos. As análises estatísticas foram realizadas com a ANOVA de duas vias seguida de Tukey.

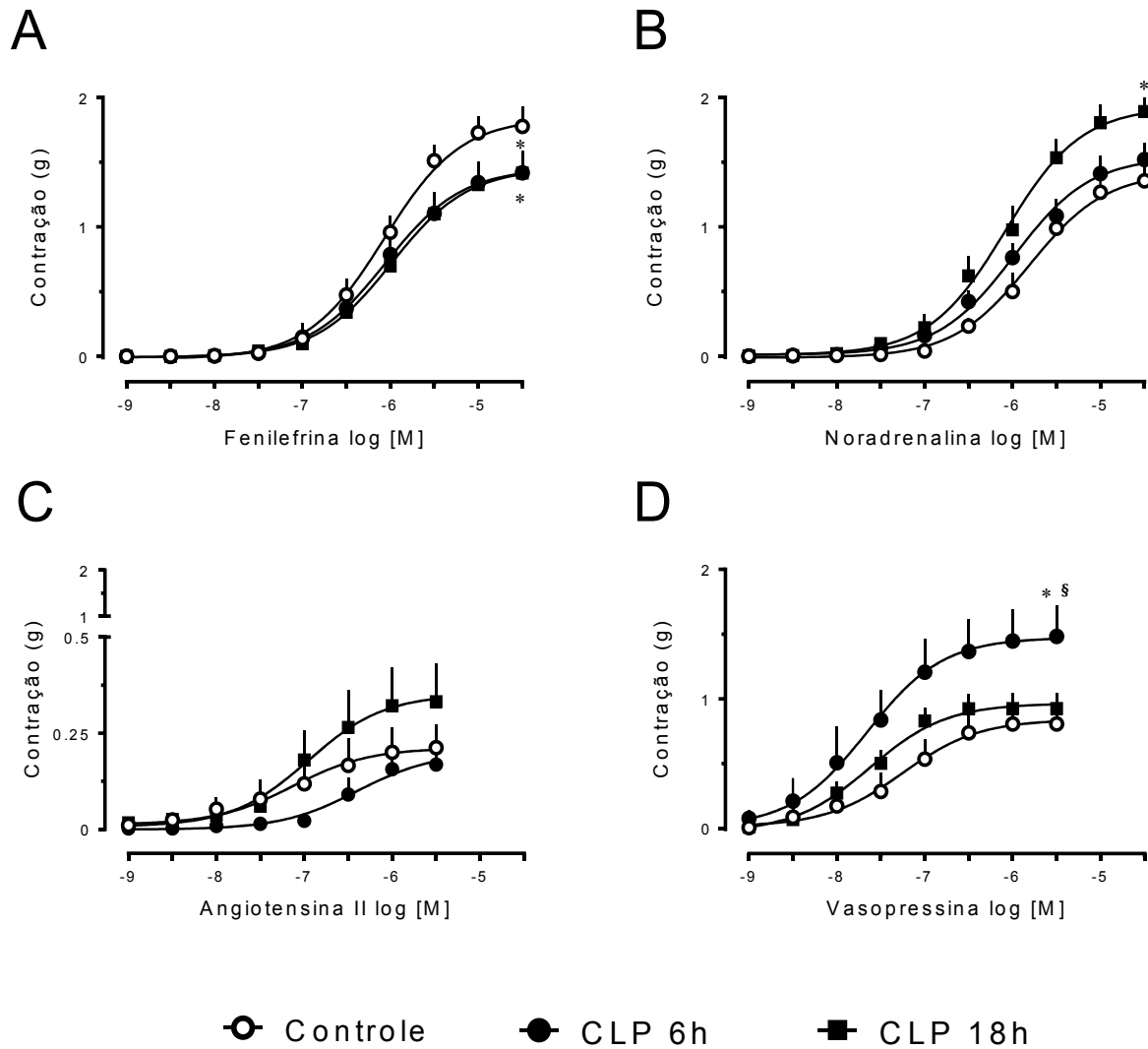


**Figura 7. Redução da reatividade vascular a vasoconstritores em artérias carótidas de ratos submetidos ao modelo de ligadura e perfuração do ceco.** As curvas de concentração resposta a fenilefrina (A), noradrenalina (B), angiotensina II (C) e vasopressina (D) foram construídas em artérias carótidas obtidas a partir do grupo controle e grupos submetidos à CLP 6 h e 18 h. Os valores mostram a média  $\pm$  erro padrão da média de 5-7 preparações por grupo. \* indica  $p < 0,05$  comparado com o grupo controle; # indica  $p < 0,05$  comparado com o grupo CLP 6 h.

**Tabela 5.** Reatividade vascular da artéria carótida obtida dos grupos controle e submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco a vasoconstritores.

	Fenilefrina	Noradrenalina	Angiotensina II	Vasopressina
<b>Controle</b> ( <i>n</i> = 5-7)				
<i>E</i> <sub>max</sub> (g)	0,27 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,11 ± 0,008
CE <sub>50</sub> (μM)	0,062 (0,032 - 0,12)	0,041 (0,02 - 0,07)	0,017 (0,007 - 0,04)	0,13 (0,06 - 0,24)
<b>CLP 6 h</b> ( <i>n</i> = 5-7)				
<i>E</i> <sub>max</sub>	0,19 ± 0,01*	0,12 ± 0,009*	0,30 ± 0,02	0,08 ± 0,004
CE <sub>50</sub> (μM)	0,058 (0,029 - 0,11)	0,034 (0,01 - 0,09)	0,083 (0,03 - 0,17)	0,046 (0,02 - 0,07)
<b>CLP 18 h</b> ( <i>n</i> = 5-7)				
<i>E</i> <sub>max</sub>	0,12 ± 0,007*†	0,15 ± 0,01*	0,15 ± 0,01*†	0,05 ± 0,007*
CE <sub>50</sub> (μM)	0,044 (0,020 - 0,09)	0,049 (0,01 - 0,13)	0,11 (0,02 - 0,42)	0,07 (0,01 - 0,36)

*E*<sub>max</sub> = Efeito máximo contrátil. CE<sub>50</sub> = Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo. As artérias carótidas foram obtidas do grupo controle e dos grupos submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco nos tempos de 6 h e 18 h após o processo cirúrgico e tiveram a reatividade vascular avaliada em banhos de órgãos. As análises estatísticas foram realizadas com a ANOVA de duas vias seguida de Tukey. \* Indica *p* < 0,05 em comparação com o grupo controle. † indica *p* < 0,05 em comparação com grupo o CLP 6 h.



**Figura 8. A artéria caudal de ratos submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco apresenta respostas reduzidas à fenilefrina, mas é hiper-reativa à noradrenalina e à vasopressina.** As curvas concentração resposta a fenilefrina (A), noradrenalina (B), angiotensina II (C) e vasopressina (D) foram construídas em artérias caudal obtidas de ratos do grupo controle e dos grupos CLP 6 h e 18 h. Os valores mostram a média  $\pm$  erro padrão da média de 5-7 preparações por grupo. \* indica  $p < 0,05$  comparado com o grupo de controle; § indica  $p < 0,05$  comparado com o grupo CLP 6 h.

**Tabela 6.** Reatividade vascular de artérias caudal do grupo controle e submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco a vasoconstritores.

	Fenilefrina	Noradrenalina	Angiotensina II	Vasopressina
<b>Controle</b> ( <i>n</i> = 5–6)				
<i>E</i> <sub>max</sub> (g)	1.83 ± 0.05	1.42 ± 0.10	0.21 ± 0.03	0.83 ± 0.09
EC <sub>50</sub> (μM)	0.85 (0.60 - 1.20)	1.56 (0.75 - 3.22)	0.07 (0.011 - 0.47)	0.055 (0.016 - 0.187)
<b>CLP 6 h</b> ( <i>n</i> = 5–7)				
<i>E</i> <sub>max</sub>	1.45 ± 0.07*	1.53 ± 0.05	0.19 ± 0.03	1.47 ± 0.123*, †
EC <sub>50</sub> (μM)	0.88 (0.49 - 1.59)	1.03 (0.70 - 1.53)	0.39 (0.11 - 1.34)	0.022 (0.0073 - 0.065)
<b>CLP 18 h</b> ( <i>n</i> = 5–7)				
<i>E</i> <sub>max</sub>	1.45 ± 0.03*	1.92 ± 0.06*	0.35 ± 0.05	0.96 ± 0.05
EC <sub>50</sub> (μM)	1.04 (0.79 - 1.35)	0.82 (0.55 - 1.22)	0.11 (0.025 - 0.47)	0.023 (0.012 - 0.046)

*E*<sub>max</sub> = Efeito máximo contrátil. CE<sub>50</sub> = Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo. As artérias caudal foram obtidas do grupo controle e dos grupos submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco nos tempos de 6 h e 18 h após o processo cirúrgico e tiveram a reatividade vascular avaliada em banhos de órgãos. As análises estatísticas foram realizadas com a ANOVA de duas vias seguida de Tukey. \* Indica *p* < 0,05 em comparação com o grupo controle. † indica *p* < 0,05 em comparação com grupo o CLP 6.

#### 4.9. PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA REATIVIDADE DA ARTÉRIA MESENTÉRICA À FENILEFRINA E NORADRENALINA.

Esta etapa do estudo foi desenvolvida em virtude das diferenças observadas na responsividade da artéria mesentérica superior para a fenilefrina e noradrenalina (agonistas de receptores  $\alpha$ - adrenérgico), uma vez que em vasos de animais dos grupos CLP a fenilefrina apresentou uma hiporreatividade, enquanto a noradrenalina manteve a capacidade de causar contração, quando comparada ao grupo controle. O bloqueio da síntese de óxido nítrico com o L-NAME (inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase) foi capaz de aumentar consideravelmente a reatividade para a fenilefrina e noradrenalina (Fig. 9A e B, respectivamente) no grupo controle, enquanto que o bloqueio seletivo com o inibidor seletivo da isoforma induzida (iNOS) 1400W não alterou a resposta a esses vasoconstritores (Fig. 10A e B, respectivamente). Ao avaliar a participação do óxido nítrico na reatividade do grupo submetido à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco no tempo 6 h, observa-se que o bloqueio da enzima com L-NAME foi capaz de aumentar consideravelmente a  $E_{max}$  para a fenilefrina e noradrenalina (Fig. 9C e D, respectivamente). No entanto, nesse mesmo tempo (CLP 6 h) o bloqueio seletivo com o inibidor da iNOS não alterou a reatividade vascular à fenilefrina e noradrenalina (Fig. 10C e D, respectivamente). Ao avaliarmos a participação do óxido nítrico na sepse tardia, 18 h após a cirurgia de CLP, pôde-se observar que a incubação com L-NAME reverteu a hiporresponsividade à fenilefrina (Fig. 9E). O mesmo foi observado com o inibidor da iNOS quando avaliada a reatividade à fenilefrina, apesar do mesmo não ter alterado a responsividade à noradrenalina (Fig. 10F).



**Tabela 7.** Efeito do bloqueio da enzima óxido nítrico sintase sobre a resposta máxima de contração da artéria mesentérica superior em resposta à fenilefrina e à noradrenalina nos grupos controle e submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.

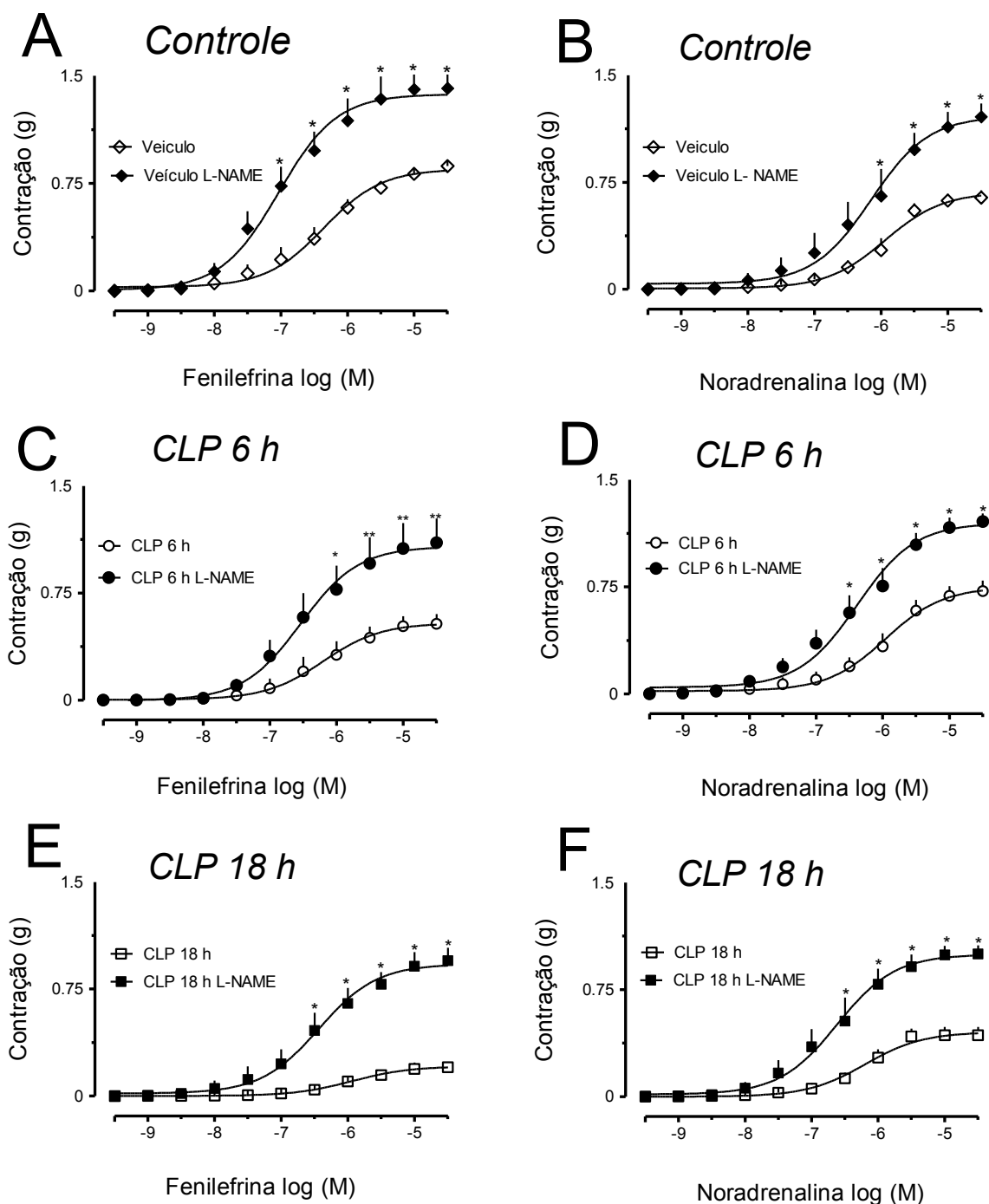
	<b>Fenilefrina (Emax)</b>	<b>Noradrenalina (Emax)</b>
<i>Controle</i>	0,85 (0,78 - 0,91)	0,68 (0,62 - 0,73)
<i>Controle L-NAME</i>	1,37 (1,25 - 1,49)	1,21 (1,09 - 1,33)
<i>CLP 6 h</i>	0,54 (0,45 - 0,62)	0,74 (0,67 - 0,82)
<i>CLP 6 h L-NAME</i>	1,07 (0,92 - 1,22)	1,19 (1,11 - 1,27)
<i>CLP 18 h</i>	0,20 (0,17 - 0,24)	0,45 (0,40 - 0,50)
<i>CLP 18 h L-NAME</i>	0,92 (0,82 - 1,02)	0,99 (0,91 - 1,08)

Emax = Efeito máximo, em gramas. As artérias mesentéricas foram obtidas do grupo controle e dos grupos submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco nos tempos de 6 h e 18 h após o processo cirúrgico e tiveram a reatividade vascular avaliada a fenilefrina e noradrenalina após a incubação com L-NAME.

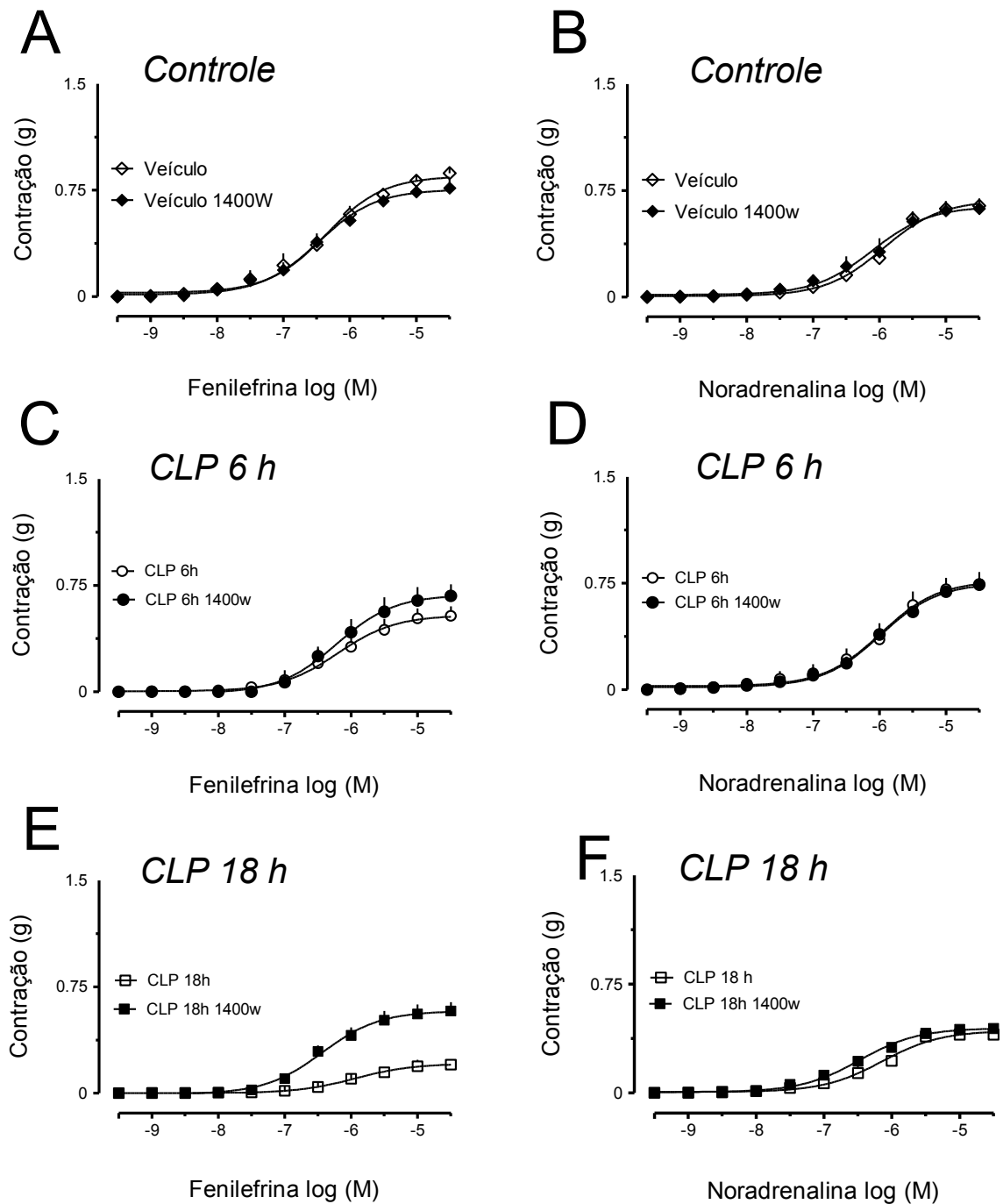
**Tabela 8.** Efeito do bloqueio seletivo da enzima óxido nítrico sintase sobre a resposta máxima de contração da artéria mesentérica superior em resposta à fenilefrina e à noradrenalina nos grupos controle e submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.

	<b>Fenilefrina (Emax)</b>	<b>Noradrenalina (Emax)</b>
<i>Controle</i>	0,85 (0,78 - 0,91)	0,68 (0,62 - 0,73)
<i>Controle 1400W</i>	0,75 (0,70 - 0,80)	0,63 (0,57 - 0,70)
<i>CLP 6 h</i>	0,54 (0,45 - 0,62)	0,76 (0,68 - 0,85)
<i>CLP 6 h 1400W</i>	0,68 (0,60 - 0,76)	0,75 (0,71 - 0,79)
<i>CLP 18 h</i>	0,20 (0,17 - 0,24)	0,42 (0,37 - 0,48)
<i>CLP 18 h 1400W</i>	0,58 (0,52 - 0,63)	0,44 (0,41 - 0,47)

Emax = Efeito máximo, em gramas. As artérias mesentéricas foram obtidas do grupo controle e dos grupos submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco nos tempos de 6 h e 18 h após o processo cirúrgico e tiveram a reatividade vascular avaliada a fenilefrina e noradrenalina após a incubação com 1400W.



**Figura 9. Bloqueio do óxido nítrico sintase pelo L-NAME restaura a responsividade em artéria mesentérica superior à fenilefrina em ratos submetidos ao modelo de ligadura e perfuração do ceco.** As curvas concentração resposta foram construídas em artérias mesentérica obtidas de ratos dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h a fenilefrina (A, C, E) e noradrenalina (B, D, F). Os valores mostram a média  $\pm$  erro padrão da média de 5-6 preparações por grupo de animais \* indica  $p < 0,05$  comparado com o grupo de controle.



**Figura 10. Bloqueio seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzida restaura a responsividade em artéria mesentérica superior à fenilefrina em ratos submetidos ao modelo de ligadura e perfuração do ceco.** As curvas concentração resposta foram construídas em artérias mesentérica obtidas de ratos dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h a fenilefrina (A, C, E) e noradrenalina (B, D, F). Os valores mostram a média  $\pm$  erro padrão da média de 5-6 preparações por grupo de animais \* indica  $p < 0,05$  comparado com o grupo de controle.

## V. DISCUSSÃO

Apesar de diversas pesquisas e dos avanços significativos tanto na terapia antimicrobiana como de suporte hemodinâmico, a sepse continua um dos principais problemas de saúde pública, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. A terapêutica é guiada pela reposição de fluidos e terapia inotrópica e vasopressora. Entretanto, a existência de hiporresponsividade cardiovascular aos fármacos vasoativos contribui para a elevada mortalidade geral. Apesar de estabelecido o arsenal terapêutico, a utilização de vasopressores ainda promove discussões acerca da melhor escolha de vasoconstritor e inotrópico, com poucos estudos na literatura sobre a modulação de diferentes leitos vasculares diante dos agentes vasopressores endógenos e comumente utilizados na clínica em humanos.

Como modelo experimental para a indução da sepse utilizamos o modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP), descrito em 1980 por Wichtermann, Baue Chaudry, considerado o “padrão ouro” nas investigações acerca dessa patologia, uma vez que é capaz de reproduzir as alterações fisiopatológicas observadas em pacientes sépticos (WICHTERMAN, *et al.*, 1980). O modelo de CLP é considerado por muitos pesquisadores como um teste pré-clínico importante para qualquer tratamento novo na sepse humana. Comparado a outros modelos experimentais, como por exemplo o modelo de endotoxemia, que consiste na inoculação de toxinas exógenas diretamente no sangue de animais, o modelo de CLP fornece uma melhor representação da complexidade envolvida na sepse humana, uma vez que é desencadeada lentamente através da combinação de três insultos: I) trauma do tecido decorrente da laparotomia; II) necrose causada pela ligadura do ceco; III) infecção devido à peritonite seguida pela translocação entérica de bactérias na corrente sanguínea (DEJAGER, PINHEIRO *et al.*, 2011). A padronização do modelo de sepse é extremamente importante para a homogeneidade dos grupos experimentais, uma vez que o parâmetro de gravidade é seguido pelo número de perfurações, força no procedimento de oclusão e compressão do ceco, bem como a quantidade de fezes a ser extravasada. São detalhes importantes, pois, a depender do experimentador, o tempo de instalação da sepse, o aparecimento de sinais e sintomas e a mortalidade podem diferir significativamente. Assim, a curva de sobrevivência, a avaliação da pressão arterial sistólica, a temperatura corpórea e do peso corporal previamente descritos na sessão de resultados 4.1 nos guiou para a escolha dos tempos de 6 h e 18 h para

serem utilizados como referentes ao estágio inicial e tardio da sepse, respectivamente. É observado que pacientes com quadro de sepse apresentam sinais clínicos importantes, tais como alteração no estado de consciência, temperatura (hipertermia ou hipotermia, mudanças na coloração da pele, hiperglicemia, hipotensão, oligúria, taquipnéia (hipoxemia/hipocalemia), taquicardia, déficit de oxigênio e alterações hematológicas (leucocitose ou leucopenia, plaquetopenia e aumento no número de bastonetes (GONZALES; LALLIER, 2010; JUNIOR *et al.*, 1998), corroborando com nossos resultados.

Esse é o primeiro estudo que avalia e compara a responsividade de diferentes artérias, oriundas de regiões diferentes do sistema cardiovascular, tais como a artéria renal, artéria mesentérica superior, artéria carótida e artéria caudal a vasoconstritores endógenos (vasopressina, angiotensina II e noradrenalina), e utilizados na clínica em humanos (noradrenalina, vasopressina e fenilefrina).

Os resultados descritos neste estudo demonstram claramente um prejuízo na reatividade da artéria mesentérica superior do grupo de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco 6 h e 18 h após a cirurgia, incluindo respostas reduzidas à fenilefrina e à angiotensina II, mas não para a noradrenalina e vasopressina, enquanto artérias renais obtidas a partir dos mesmos grupos experimentais não apresentaram qualquer alteração significativa na capacidade de resposta a esses vasoconstritores. É importante ressaltar que a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco em nossos experimentos resultou em uma taxa de mortalidade de cerca de 40% e que todos os animais apresentaram-se hipotensos mesmo recebendo reposição volêmica (Fig. 2). Nos seres humanos, a administração contínua de vasoconstritores é uma estratégia importante recomendada por orientações atuais no tratamento da sepse associada à hipotensão, principalmente para melhorar a perfusão de sangue tecidual e, como mencionado anteriormente, a noradrenalina é a primeira escolha como agente vasopressor a ser utilizado (DELLINGER *et al.*, 2013).

No entanto, é importante mencionar que uma série de estudos experimentais com diferentes modelos de sepse demonstraram que órgãos vitais, tais como o intestino e rins podem apresentar respostas reduzidas ou melhorar o fluxo de sangue dependendo do vasoconstritor administrado, do modelo experimental ou do período de sepse avaliado (BENNETT *et al.*, 2004; REVELLY *et al.*, 2000; HILTEBRAND *et al.*, 2007; KREJCI *et al.*, 2006). Por exemplo, em modelo séptico induzido em suínos, a administração de noradrenalina foi capaz de aumentar a pressão arterial média, mas

simultaneamente reduzir o fluxo sanguíneo na artéria mesentérica superior (KREJCI *et al.*, 2006). Segundo NAKAJIMA *et al.*, (2006), apesar da possível diferença nas distribuições de receptor entre noradrenalina e vasopressina, há um padrão muito semelhante de efeitos destas duas drogas sobre a microcirculação do intestino.

Boffa, Jean-Jacques; Arendshorst, William (2005) mostraram que camundongos endotoxêmicos apresentam hipotensão arterial sistêmica concomitantemente com a manutenção da reatividade vascular renal aos vasoconstritores noradrenalina, angiotensina II e vasopressina, contribuindo para a insuficiência renal aguda encontrada no choque séptico. Além disso, verificaram também sensibilidade normal à vasopressina em outros leitos vasculares, sugerindo que as espécies reativas de oxigênio (ROS) e o óxido nítrico poderiam estar modulando as alterações nestes vasos. Segundo BENKUSKY *et al.*, (1999) o peroxinitrito pode interferir seletivamente com o sistema adrenérgico modulando alterações significativas na função vascular durante estados de inflamação, como aterosclerose, lesão de isquemia-reperfusão, ou sepse, onde a formação de peroxinitrito é favorecida. Diversos estímulos como tensão de cisalhamento, isquemia, angiotensina II, infecção e citocinas (TNF-alfa) nas células endoteliais podem gerar ROS. De acordo com Guzman *et al.*, (2003), a administração de vasopressina restaurou o fluxo sanguíneo renal durante a endotoxemia em cães, com efeitos sistêmicos e regionais semelhantes à noradrenalina.

Assim, é razoável sugerir que, apesar de redução na pressão arterial sistêmica, a manutenção da reatividade vascular à noradrenalina e à vasopressina em artérias mesentéricas, e a todos os vasoconstritores avaliados nas artérias renais do grupo de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco, podem contribuir significativamente para os efeitos deletérios da terapia vasopressora no fluxo sanguíneo e na função do trato intestinal e rins durante o estado séptico. Notavelmente, o significado prático destes resultados merece uma investigação mais aprofundada.

Também exploramos o perfil de responsividade de artérias carótidas provenientes do grupo de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco. Para nosso conhecimento, existem poucos estudos na literatura que investigaram os efeitos da sepse sobre as respostas vasculares *in vitro* em artérias carótidas e estes foram restritos a abordagens utilizando animais endotoxêmicos. Estes estudos descrevem a reatividade vascular reduzida ao análogo de tromboxano

U46619 em vasos de ratos com deficiência de IL-10, e a reatividade aumentada para doadores de óxido nítrico como a nitroglicerina, na artéria carótida de suínos 6 h e 3 h, respectivamente, após a administração de lipopolissacarídeo (ARDEN *et al.*, 1994; GUNNETT *et al.*, 1999). Nossos resultados confirmam o desenvolvimento de disfunção vascular também na artéria carótida de ratos submetidos à sepse induzida pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco. Além disso, nossos resultados também revelaram que, diferentemente das artérias renais (que não apresentam qualquer prejuízo em suas respostas contráteis), ou artérias mesentéricas (em que a perda de reatividade foi dependente do agonista utilizado), as artérias carótidas parecem desenvolver uma hiporreatividade mais abrangente a todos os vasoconstritores investigados neste estudo. Com efeito, todos os agentes testados em nossos experimentos, incluindo a vasopressina, que tem sido mostrada capaz de aumentar a pressão arterial em pacientes com choque séptico que apresentam refratariedade para a noradrenalina (HOLMES *et al.*, 2001; TSUNEYOSHI *et al.*, 2001), tiveram eficácia reduzida em artérias carótidas obtidas de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco. Alterações no tônus da artéria carótida poderiam influenciar o fluxo sanguíneo cerebral (MEYER *et al.*, 1967). Apesar de alguns estudos experimentais não apresentarem nenhuma redução no fluxo de sangue da artéria carótida em ratos submetidos à sepse pelo modelo de CLP, ou de inoculação de lipopolissacarídeos (BÄNZIGER *et al.*, 2015; MORTAZA *et al.*, 2009; ROSENGARTEN *et al.*, 2008), pacientes com sepse podem apresentar redução do fluxo sanguíneo cerebral (BOWTON *et al.*, 1989). Pacientes com sepse também podem desenvolver encefalopatia, a qual é pelo menos em parte associada com fluxo sanguíneo inapropriado no cérebro (PAPADOPOULOS *et al.*, 2000), reforçando a importância de uma melhor compreensão acerca da reatividade vascular das artérias carótidas a vasoconstritores endógenos, bem como a vasopressores administrados durante o estado séptico.

A importância das alterações no sistema renina angiotensina para a função vascular na sepse ainda é pouco investigada. Estudos iniciais revelaram um aumento agudo nos níveis plasmáticos de atividade da renina, após a administração de lipopolissacarídeos em diferentes estudos com animais (ISAKSON *et al.*, 1977; SCHALLER *et al.*, 1985), o que também foi documentado em pacientes sépticos (DOERSCHUG *et al.* 2010; HILGENFELDT *et al.* 1987). A importância de tais alterações permanece controversa, uma vez que estudos clínicos têm sugerido que

altos níveis plasmáticos de renina e angiotensina II podem contribuir para a disfunção microvascular na sepse (DOERSCHUG *et al.*, 2010). Uma redução nos níveis circulantes da enzima conversora de angiotensina I e angiotensina II também associada com altas taxas de mortalidade entre os pacientes com sepse severa (ZHANG *et al.*, 2014). Curiosamente, há poucos estudos que exploram a reatividade a angiotensina II em preparações vasculares obtidas a partir de animais submetidos a modelos experimentais de sepse (CAMERON *et al.*, 1998; DE SOUZA *et al.*, 2015; MASTRANGELO *et al.*, 2000). Assim, ao menos pelo que conhecemos, este é o primeiro estudo que comparou os efeitos contráteis da angiotensina II entre os diferentes vasos no modelo da sepse induzida por ligadura e perfuração do ceco. Nossos dados demonstram que tanto a artéria mesentérica como artérias carótidas de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco exibem reatividade reduzida para a angiotensina II, em comparação com preparações do grupo controle. Curiosamente, os experimentos realizados nas preparações obtidas do grupo controle revelam que a angiotensina II induz respostas contráteis significativamente menores do que a fenilefrina, noradrenalina ou vasopressina. Levando-se em consideração o papel fisiológico da angiotensina II sobre a regulação do tônus vascular e pressão arterial (para revisão ver PAUL *et al.* 2006), o reconhecimento de que durante o insulto séptico os efeitos da angiotensina II sobre o tônus vascular são reduzidos, pelo menos em parte do sistema vascular, pode permitir uma melhor compreensão sobre a importância e os riscos de estratégias farmacológicas que envolvam tanto a ativação como a inibição do sistema renina-angiotensina no tratamento do choque séptico.

A hipotensão arterial e o baixo fluxo de sangue em órgãos e tecidos na sepse tem sido amplamente estudados, e estão supostamente associados à incapacidade dos vasos em manter regularmente o tônus vascular em resposta a neurotransmissores endógenos (por exemplo, à estimulação simpática local por noradrenalina), hormônios (por exemplo, catecolaminas circulantes, vasopressina, angiotensina II), bem como a resposta aos agentes vasoativos administrados. No entanto, encontramos que apesar de redução na responsividade vascular à fenilefrina, a artéria caudal obtida do grupo CLP nos tempos 6 h e 18 h apresentou um aumento na resposta contrátil à noradrenalina e à vasopressina, respectivamente. Apesar da artéria caudal de ratos não ser comparável diretamente com qualquer vaso encontrado nos seres humanos, uma série de estudos *in vitro* foram conduzidos com este vaso principalmente para explorar a biologia de artérias vasculares com diâmetro



reduzido, quando comparados com as preparações vasculares clássicas (isto é, anéis de aorta). Levando-se em consideração nossos achados obtidos em ratos submetidos ao modelo de ligadura e perfuração do ceco, é razoável concluir que apesar da insuficiência vascular que ocorre durante o insulto séptico, alguns vasos podem apresentar respostas aumentadas para agentes vasoconstritores, incluindo a noradrenalina. Embora os mecanismos celulares envolvidos nesse fenômeno, bem como a sua relação com a vasculatura humana devam ser melhor esclarecidos, o conhecimento acerca da existência de um perfil diferencial de alterações na reatividade vascular, que varia ao longo do tempo, pode contribuir para conhecimentos adicionais sobre o uso e manutenção da terapia vasopressora em pacientes sépticos.

Tendo em vista que o óxido nítrico está implicado na vasoplegia envolvida no choque séptico (BEISHUIZEN *et al.*, 1998; TITHERADGE, 1999; FLEMING *et al.*, 1991), iniciamos neste trabalho de dissertação uma pequena parte acerca dos mecanismos envolvidos na refratariedade aos vasoconstritores na sepse. Assim, nossos resultados apontam para o envolvimento do óxido nítrico, uma vez que o bloqueio com L-NAME, inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase elevou a responsividade à fenilefrina quando comparado ao controle, tanto na sepse recente quanto tardia.

A isoforma induzida iNOS ou NOS 2, tem expressão regulada por citocinas e produtos bacterianos (GELLER *et al.*, 1998; CLEMENTE, 2003). Em nossos experimentos, 6 h após a CLP, o bloqueio com inibidor seletivo da iNOS não alterou a responsividade na sepse no tempo 6 h após à CLP para a fenilefrina e noradrenalina, corroborando com dados encontrados na literatura em que o pico de expressão da NOS-2 ocorre por volta de 12 horas após o início da sepse experimental. Assim, sugere-se que no início da sepse o envolvimento do óxido nítrico é decorrente de outras isoformas. Curiosamente na fase tardia o bloqueio da iNOS reverteu a hiporresponsividade vascular a fenilefrina, enquanto que sua inibição não alterou a reatividade para a noradrenalina. Segundo Martin *et al.*, (1993) a noradrenalina melhora a pressão arterial sistêmica, o débito urinário, a oferta e o consumo de O<sub>2</sub> em pacientes com choque séptico. Tratamentos *in vivo* com inibidor da iNOS antes da administração de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) reduziram a hipotensão e melhoraram a reatividade pressórica e a mortalidade subsequente (WU *et al.*, 1996). Entretanto, a inibição da NOS-2 não preveniu o desenvolvimento da hiporreatividade

vascular nem modificou a sobrevivência dos animais submetidos à CLP (VROMEN *et al.*, 1996). Mesmo inibidores considerados mais seletivos da NOS-2 produziram um aumento na mortalidade em um modelo utilizando o LPS (TRACEY *et al.*, 1995). Assim, nossos dados revelam que o óxido nítrico proveniente da isoforma induzida participa em parte da hiporresponsividade aos vasoconstritores. Segundo Nardi, (2011) a fonte mais provável de NO nos leitos vasculares, que contribui para hiporeatividade vascular, parece ser a derivada da NOS-1. No entanto, não avaliamos o envolvimento na NOS 1 na responsividade da artéria mesentérica à fenilefrina e noradrenalina.

Embora nosso estudo tenha sido limitado à avaliação farmacológica *in vitro* e ainda não tenhamos investigado os mecanismos envolvidos nos resultados apresentados, podemos concluir que existem diferenças notáveis no desenvolvimento da disfunção contrátil entre vasos de ratos submetidos ao modelo de ligadura e perfuração do ceco. A função vascular pode variar desde a refratariedade amplamente descrita, a resposta inalterada, ou até mesmo hiporresponsividade a vasoconstritores, em conformidade com o vaso, o agente vasoativo ou o período avaliado. O melhor conhecimento sobre esse comportamento diferencial de resposta de vasos a agentes vasoconstritores, incluindo a noradrenalina produzida endogenamente, angiotensina II, e vasopressina, assim como a relevância de tais diferenças de sepse associada a disfunção orgânica pode fornecer novas perspectivas na gestão da disfunção cardiovascular na sepse.

## **VI. CONCLUSÃO**

Em resumo nossas investigações mostram claramente que diferentes artérias obtidas a partir de diferentes sistemas, apresentam perfis de resposta diferentes aos vasoconstritores endógenos e utilizados na clínica em humanos no tratamento na sepse. Assim, podemos concluir que a refratariedade a terapia vasoconstritora no choque séptico é dependente:

- da artéria avaliada;
- do vasopressor utilizado;
- do tempo após a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.

## REFERÊNCIAS

- AKIRA SHIZUO; TAKEDA KIYOSHI; KAISHO TSUNEYASU. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature**, v, 2. p. 665- 680, 2001.
- AHLQUIST, R.P. A study of the adrenotropic receptors. **American Journal Physiology**, v.153, p. 586-600, 1948.
- ALI, M.S.; SAYESKI, P.P.; BERNSTEIN, K.E. Jak2 acts as both a STAT1 kinase and as a molecular bridge linking Stat1 to the angiotensin II AT1 receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.15586-15593, 2000.
- ANDROUTSOS, G.; KARAMANOU, M.; STEFANADIS, C. The contribution of Alexandrian Physicians to cardiology. **The Hellenic Journal of Cardiology**, v.54, p.15-17, 2013.
- ANGUS; ZWIRBLE; CLERMONT; PINSKY. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine*, v, 29.p.1303-1310, 2001.
- ANGUS, D.C., DEUTSCHMAN, C.S., MACHADO, F.R., RUBENFELD, G.D., WEBB, S.A., BEALE, R.J., VINCENT, J.L. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 2, p. 580-637, 2013.
- ANNANE, DJILLALI; BELLISSANT, ERIC; CAVAILLON, JEAN-MARC. Septic shock. *The Lancet*, v. 365, p. 63 – 78, 2005.
- ARDEN, W.A., FISCUS, R.R., WANG, X., MALEY, R., LANZO, S., AND GROSS, D.R. Early endotoxic shock results in enhanced vasodilator responses to nitroglycerin but unaltered responses to neuropeptides calcitonin gene-related peptide and substance P. **Shock**, v.1, n.6, p. 425-431, 1994.
- ARELLANO, D.L.; HANNEMAN, S.K. Vasopressor weaning in patients with septic shock. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 26, p.413-425, 2014.
- BANZIGER, B., REGUEIRA, T., VOGT, R., BRANDT, S., VANDEVELDE, M., AND JAKOB, S.M. Neurohistological abnormalities during early porcine endotoxemia. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v.59, n.5, p. 586-597, 2015.
- BARIÈTY, M.; COURRY, C. **Histoire de la médecine**. Paris: Fayard, p.148-196, 1963.
- BENKUSKY N.A., LEWIS S.J., KOOY N.W. Peroxynitrite-mediated attenuation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptor agonist-induced vascular responses *in vivo*. **European Journal Pharmacology**, v. 364, p. 151–158, 1998.
- BENNETT, T., MAHAJAN, R.P., MARCH, J.E., KEMP, P.A., AND GARDINER, S.M. Regional and temporal changes in cardiovascular responses to norepinephrine and

vasopressin during continuous infusion of lipopolysaccharide in conscious rats. **British Journal Anaesthesia**, v. 93, n.3, p. 400-407, 2004.

BIMBAUMER, M. Vasopressin receptors. **Endocrinology & Metabolism**, v.11, p.406-410, 2000.

BOFFA, J.J.; ARENDSHORST, W. Maintenance of renal vascular reactivity contributes to Acute Renal failure during Endotoxemic Shock. **Journal of the American Society of nephrology**, v.16, p.117-124, 2005.

BONE, R C; BALK, R A; DELLINGER R R; FEIN, A M; SHEIN R M; SIBBALD W J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. **American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine**. V, 101. P. 1644-55, 1992.

BOWTON, D.L., BERTELS, N.H., PROUGH, D.S., AND STUMP, D.A. Cerebral blood-flow is reduced in patients with sepsis syndrome. **Critical Care Medicine**, v. 17, n.5, p. 399-403, 1989.

BEISHUIZEN, A.; VERMES, I.; HAANEN, C. Endogenous mediators in sepsis and septic shock. **Advances in clinical Chemistry**, v. 33, p.55-131, 1998.

CAMERON, E.M., WANG, S.Y., FINK, M.P., AND SELLKE, F.W. Mesenteric and skeletal muscle microvascular responsiveness in subacute sepsis. **Shock** , v.9, n.3, p. 184-192, 1998.

CLEMENTE, E. The contribution of Salvador Moncada to our understanding of the biology of nitric oxide. **Life**, v.55, p.563-568, 2003.

DA SILVA, FABIANO PINHEIRO; VELASCO IRINEO TADEU. Sepse. 1. Ed. São Paulo: Manole Ltda, 2007.

DE SOUZA, S.C. **Lições de anatomia: manual de esplancnologia**. Salvador: EDUFBA, 2010, 500p.

DE SOUZA, P. **Interação do estresse oxidativo com a via rho-A/Rho-quinase (ROCK) e metaloproteinases de matriz (MMP) na disfunção vascular da sepse e pós-sepse**. 2014. 141f. Tese (Doutorado em Farmacologia), Universidade Federal do Paraná, 2014.

DE SOUZA, P., SCHULZ, R., AND DA SILVA-SANTOS, J.E. Matrix metalloproteinase inhibitors prevent sepsis-induced refractoriness to vasoconstrictors in the cecal ligation and puncture model in rats. **European Journal Pharmacology**, v. 765, p. 164-170, 2015.

DEJAGER, L.; PINHEIRO, I.; DEJONCKHEERE, E.; LIBERT, C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Microbiology**, v.19, p.198-208, 2011.

DELLINGER, R.P; LEVY, M.M., RHODES, A; ANNANE, D; GERLACH, H; OPAL, S.M; SEVRANSKY, J.E; SPRUNG, C.L; DOUGLAS, I.S; JAESCHKE, R; OSBORN, T.M; NUNNALLY, M.E; TOWNSEND, S.R; REINHART, K; KLEINPELL, R.M; ANGUS, D.C; , DEUTSCHMAN CS, MACHADO FR, RUBENFELD GD, WEBB SA, BEALE RJ, VINCENT JL, MORENO R. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. **Critical Care Medicine**, v.41, p. 580-637, 2013.

DEREK C. ANGUS; TOM VAN DER POLL. Severe Sepsis and Septic Shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, p. 840-851, 2013.

DOERSCHUG, K.C., DELSING, A.S., SCHMIDT, G.A., AND ASHARE, A. Renin-angiotensin system activation correlates with microvascular dysfunction in a prospective cohort study of clinical sepsis. **Critical Care Medicine**, v.14, n.1, R24, 2010.

ELLENDER; TIMOTHY J; SKINNER, JOSEPH C. The Use of Vasopressors and Inotropes in the Emergency Medical Treatment of Shock. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v, 26, p. 759-786, 2008.

FLEMING, I.; JULOU-SCHAEFFER, G. GRAY, G.A.; PARRATT, J.R.; STOCLET, J.C. Evidence that an L-arginine/nitric oxide dependent elevation of tissue cyclic GMP content is involved in depression of vascular reactivity by endotoxin. **British Jornal Pharmacology**, v.103, p.1047-1052, 1991.

FUNK, D. J., J. E. PARRILLO, *et al.* Sepsis and septic shock: a history. **Critical Care Clinics**, v.25, n.1, p.83-101, 2009.

FURCHGOTT & ZAWADZKI. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v. 288.p. 373-376, 1980.

GEDDES, L.A. Retrospectroscope. Discovery of the circulation of blood. **Engineering in Medicine and Biololy Magazine**, v.27, p.107-113, 2008.

GELLER, D.A.; BILLIAR, T.R. Molecular biology of nitric oxide synthases. **Cancer Metastasis Reviews**, v.17, p.7-23, 1998.

GEROULANOS, S. E E. T. DOUKA. Historical perspective of the word "sepsis". **Intensive Care Medicine**, v.32, n.12, p. 2077, 2006.

GONZALES, J.P.; LALLIER, L.E. Evidence-based acute management of sepsis-rapid intervention in the critical hours. **Perioperative Nursing clinics**, v.5, n.2, p.189-202, 2010.

GUNNETT, C.A., BERG, D.J., FARACI, F.M., AND FEUERSTEIN, G. Vascular effects of lipopolysaccharide are enhanced in interleukin-10-deficient mice. **Stroke**, v. 30, v.10, p. 2191-2195, 1999.

GUZMAN, J.A.; ROSADO, A.E.; KRUSE, J.A. Vasopressin vs. norepinephrine in endotoxic shock: systemic, renal, and splanchnic hemodynamic and oxygen transport effects. **Journal of Applied Physiology**, v.95, p.803-809, 2003.

HARDAWAY; WILLIAM; VASQUEZ. Disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Chest Journal*, v.27, p. 577583, 2001.

HASHIMOTO, C., HUDSON, K. L. & ANDERSON, K. V. The *Toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. **Cell**, 52.p.269-279, 1988.

HILGENFELDT, U., KIENAPFEL, G., KELLERMANN, W., SCHOTT, R., SCHMIDT, M. Renin-angiotensin system in sepsis. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 9, p.1493-1504, 1987.

HILTEBRAND, L.B., KREJCI, V., JAKOB, S.M., TAKALA, J., SIGURDSSON, G.H. Effects of vasopressin on microcirculatory blood flow in the gastrointestinal tract in anesthetized pigs in septic shock. **Anesthesiology**, v. 106, n.6, p.1156-1167, 2007.

HOLMES, C.L., WALLEY, K.R., CHITTOCK, D.R., LEHMAN, T., RUSSELL, J.A. The effects of vasopressin on hemodynamics and renal function in severe septic shock: a case series. **Intensive Care Medicine**, v. 27, n.8, p.1416-1421, 2001.

HOLMES, C.L.; PATEL, B.M.; RUSSELL, J.A.; WALLEY, K.R. Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. **Chest**, v.120, p.989, 1002, 2001.

HOLZMANN, JON A. BURAS, BERNHARD; SITKOVSKY, MICHAEL. Animal Models of sepsis: setting the stage. **Nature**, v. 4, p. 854-865, 2005.

ISAKSON, P.C.; SHOFR, F.; McKnight, R.C.; FELDHAUS, R.A.; RAZ, A. NEEDLEMAN, P. Prostaglandins and the renin-angiotensin system in canine endotoxemia. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v.200, p-614-622, 1977.

JUNIOR, J.A.P.; MARSON, F.; ABEID, M.; OSTINI, F.M.; DE SOUZA, S.H.; BASILE-FILHO, A. Fisiopatologia da sepse e suas implicações farmacêuticas. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.31, p.349-362, 1998.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008.

KARAMANOU, M.; STEFANADIS, C.; TSOUCALAS, G.; KONSTANTINOS, L.; ANDROUTSOS, G. Galen's (130-201AD) Conceptions of the heart. The **Hellenic Journal Cardiology**, v.56, p.197-200, 2015.

KING, ELIZABETH; BAUZÁ, GUSTAVO, MELLA, JAN R; REMICK, DANIEL. Pathophysiologic mechanisms in septic shock. **Pathobiology in focus**, v.94, p. 4-12, 2014.

KREJCI, V., HILTEBRAND, L.B., AND SIGURDSSON, G.H. Effects of epinephrine, norepinephrine, and phenylephrine on microcirculatory blood flow in the gastrointestinal tract in sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 34, n.5, p. 1456-1463, 2006.

KUMAR; HAERY; PARRILO. Myocardial Dysfunction in Septic Shock: Part I. Clinical Manifestation of Cardiovascular Dysfunction. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v.15, p.364-376, 2001.

LAVOIE, J.L.; SIGMUND, C.D. Minireview: overview of the renin-angiotensin system an endocrine and paracrine system. **Endocrinology**, v.144, p.2179-2183, 2003.

LEFER, A.M.; MARTIN, J. Origin of myocardial depressant factor in shock. **American Journal Physiology**, v.218, n.5, p.1423-1427, 1970.

MARTIN, C.M., YAGHI, A., SIBBALD, W.J., MCCORMACK, D., AND PATERSON, N.A. Differential impairment of vascular reactivity of small pulmonary and systemic arteries in hyperdynamic sepsis. **American Review of Respiratory Disease**, v. 148, n.1, p.164-172, 1993.

MARTIN, G; MANNINO, D; EATON S; MOSS, M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. **The New England Journal of Medicine**. p. 546- 1554, 2003.

MASTRANGELO, D., FROSSARD, J.L., HADENGUE, A., AND PASTOR, C.M. Sepsis decreases the spontaneous and agonist-induced contractile activities in the rat portal vein. **Journal of Hepatology**, v. 33, n.6, p. 933-940, 2000.

MEDZHITOV RUSLAN. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature**, v, 1.p.135-145, 2001.

MEDZHITOV RUSLAN; JANEWAY CHARLES JR. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunological Reviews**, v, 173.p.89-97, 2000a.

MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000b.

MEYER, J.S., YOSHIDA, K., AND SAKAMOTO, K. Autonomic control of cerebral blood flow measured by electromagnetic flowmeters. **Neurology**, v. 17, n.7, p. 638-648, 1967.

MONCADA, S., PALMER, R. M., HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MORELI, A.; ERTMER, C.; REHBERG, S.; LANGE, M.; ORECCHIONI, A.; LADERCHI, A.; BACHETONI, A.; D'ALESSANDRO, M; AKEN, H.V.; PIETROPAOLI, P.; WESTPHAL, M. Phenylephrine versus norepinephrine for initial hemodynamic support of patients with septic shock: a randomized, controlled trial. **Critical care**, v.12, 2008.



MORTAZA, S., MARTINEZ, M.C., BARON-MENGUY, C., BURBAN, M., DE LA BOURDONNAYE, M., FIZANNE, L., PIERROT, M., CALES, P., HENRION, D., ANDRIANTSITOHAINA, R., MERCAT, A., ASFAR, P., AND MEZIANI, F. Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 6, p. 2045-2050, 2009.

NAKAJIMA, Y.; BAUDRY, N.; DURANTEAU, et al. Effects of vasopressin, norepinephrine and L-arginine on intestinal microcirculation in endotoxemia. **Critical Care Medicine**, p.1752-1757, 2005.

NARDI, G.M. **Óxido nítrico proveniente da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (NOS-1): será a NOS-1 o cérebro por trás da hiporesponsividade vascular durante a sepse**. 2011. 138f. Tese (Doutorado em farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

NDUKA, OKORIE O; PARRILLO, JOSEPH. The pathophysiology of septic shock. **Critical Care Clinics**, v, 25, p.677-702, 2009.

OUDEN, D.D.T.; MEINDERS, A.E. Vasopressin: physiology and clinical use in patients with vasodilatory shock: a review. **Netherlands Journal Medicine**, v.63, p.4-13, 2005.

PAPADOPOULOS, M.C., DAVIES, D.C., MOSS, R.F., TIGHE, D., AND BENNETT, E.D. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. **Critical Care Medicine**, v.28, n.8, 3019-3024, 2000.

PAUL, M., POYAN MEHR, A., AND KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiological Reviews**, v. 86, n.3, p. 747-803, 2006.

RABUEL C, MEBAZAA A. Septic shock: a heart story since the 1960s. **Intensive Care Medicine**, v. 32, p.799–807, 2006.

PETERSON, LYSLE H. Symposium on regulation of the cardiovascular system in health and disease. **Circulation**, v. 11, p. 739-943, 1960.

REVELLY, J.P., LIAUDET, L., FRASCAROLO, P., JOSEPH, J.M., MARTINET, O., AND MARKERT, M. Effects of norepinephrine on the distribution of intestinal blood flow and tissue adenosine triphosphate content in endotoxic shock. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 7, p. 2500-2506, 2000.

REINHART, KONRAD; DANIELS, RON; MACHADO, FLAVIA RIBEIRO. The burden of sepsis: a call to action in support of World Sepsis Day. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 25. p. 3-5, 2013.

ROSENGARTEN, B., HECHT, M., WOLFF, S., AND KAPS, M. Autoregulative function in the brain in an endotoxic rat shock model. **Inflammation Research**, v.57, n.11, p. 542-546, 2008.

SAGY MAYER; AL-QAQAA YASIR; KIM PAUL. Definitions and Pathophysiology of Sepsis. **Current Problems in Pediatric Adolescent Health Care**, v. 43.p. 260-263, 2013.

SCHALLER, M.D., WAEBER, B., NUSSBERGER, J., AND BRUNNER, H.R. Angiotensin II, vasopressin, and sympathetic activity in conscious rats with endotoxemia. **American Journal Physiology**, v. 249, n. 6, 1985.

SILVA, PENILDON. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1038 p.

TALLO, F, S; GUIMARÃES, H, P; LOPES, R, D; VENDRAME, L, S; LOPES, A, C. Drogas Vasopressoras nos Estados Choque: Qual é a Melhor Opção? **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 6, p. 237-24, 2008.

TITHERADGE, M.A. Nitric oxide in septic shock. **Biochemical et biophysical Acta**, v.5, p.437-455, 1999.

THOMAS, S.; RAMACHANDAN, A.; PATRA, S.; VIDYASAGAR, S.; BALASUBRAMANIAN, K.A. Nitric oxide protects the intestine from the damage induced by laparotomy and gut manipulation. **Journal of Surgical Research**, v.99, p.25-32, 2001.

TRACEY, W.R.; NAKANE, M.; BASHA, C.G. In vivo pharmacological evaluation of two novel type II (inducible) nitric oxide synthase inhibitors. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, v.73, p.665-669, 1995.

TSUNEYOSHI, I., YAMADA, H., KAKIHANA, Y., NAKAMURA, M., NAKANO, Y., AND BOYLE, W.A. Hemodynamic and metabolic effects of low-dose vasopressin infusions in vasodilatory septic shock. **Critical Care Medicine**, v.29, n.3, p. 487-493, 2001.

VICENT, J.L. Update on sepsis: pathophysiology and treatment. **Acta Clinica Belgica**, v.55, p.79-87, 2000.

VROMEN, A.; ARKOVITZ, M.S.; ZINGARELLI, B. et al. Low-level expression and limited role for the inducible isoform of nitric oxide synthase in the vascular hyporeactivity and mortality associated with cecal ligation and puncture in the rat. **Shock**, v. 6, p.248-253, 1996.

WEB, C.R. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology education**, v.27, n.4, p.201-206, 2003.

WEIL M H; SHUBIN H; CARLSON R. Treatment of circulatory shock. Use of sympathomimetic and related vasoactive agents. The Journal of the American Medical Association, v, 24.p.1280-1286,1975.

WICHTERMAN, KEITH A; BAUE ARTHUR, E; CHAUDRY, IRSHAD H. Sepsis and septic shock - A review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research*, v, 29, p. 189–201, 1980.

WU, C.C.; RUETTEN, H.; THIEMERMANN, C. Comparison of the effects of aminoguanidine and N omega-nitro-L-arginine methyl ester on the multiple organ dysfunction caused by endotoxaemia in the rat. **European Journal Pharmacology**, v.300, p.99-104, 1996.

ZARYCHANSKI, RYAN; ROBERT E. ARIANO; BOJAN, PAUNOVIC; DEAN D. BELL. Historical Perspectives in Critical Care Medicine: Blood Transfusion, Intravenous Fluids, Inotropes /Vasopressors, and Antibiotics. **Critical Care Clinics.**, v.25, p. 201-220, 2009.

ZHANG, W., CHEN, X., HUANG, L., LU, N., ZHOU, L., WU, G., AND CHEN, Y. Severe sepsis: Low expression of the renin-angiotensin system is associated with poor prognosis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 7, n.5, p.1342-1348, 2014.